

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POST-GRADO

**Caracterización estructural, biológica y molecular de
una isoenzima básica de Fosfolipasa A2 del veneno de
la serpiente peruana *Lachesis muta* (Linnaeus, 1766)**

TESIS

Para optar al grado académico de Magister en Biología Molecular

AUTOR

Rosalina Rosio Inga Arellano

Lima-Perú

2010

*Ama al Señor porque escucha el clamor de mi plegaria
Inclina hacia mí su oído el día en que lo llame
Estaba yo sin fuerza y me salvó
Al Señor, en mi angustia, recurrí me respondió, sacándome de apuros
Si yo tengo al Señor, no tengo miedo
¿Qué podrá hacerme el hombre?*

DEDICATORIA

A Dios, por su bendición, su fuerza y su amor

*A mis amados padres David y Rosalina
por su amor, paciencia y apoyo
incondicional.*

*A mis dos angelitos
mis sobrinos Sebastián y Rodrigo*

*A mis queridísimos hermanos
Daly, Joel y Antonio
y a mis cuñadas Maribel, JuliaElisa y Carla*

AGRADECIMIENTOS

A la Memoria del Maestro Orestes Málaga Málaga por inculcar ciencia, creer en los sueños de un mejor laboratorio y enseñarme a no rendirme.

Al Dr. Armando Yarlequé Jefe del laboratorio de Biología Molecular por su asesoramiento durante la elaboración del presente trabajo.

Al Dr. Cesar Cabezas Jefe del Instituto Nacional de Salud por su apoyo brindado para el perfeccionamiento con la pasantía en Italia.

A los Drs. José Maria Gutiérrez y Bruno Lomonte por compartir sus conocimientos, por sus enseñanzas, ayuda y amistad brindada. Así mismo mi gran respeto y cariño a Mauren, Oscar, Marvin, Melvin, Julian, Carmen, Rigo, Laura, Teresa, Alvaro y todos los compañeros y compañeras del Instituto Clodomiro Picado-Costa Rica.

Al los Drs. Alessandro Bartoloni, Fillippo Bartalesi, Dra. Marianne Strohmeyer por la oportunidad de ampliar mis conocimientos y su gentileza en Firenze-Italia.

Al Dr. Jean-Denis Docquier por su constante interés en mi avance profesional, a la Dra. Lucia Henrici DeAngelis, porque en esas dos ultimas semanas aprendí más que en 2 años, a los dos les brindo mi eterno agradecimiento.

Al Dr. Gian Maria Rossolini, así como a todo el grupo: Tiziana, Lucia, Eleonora, Samanta, Gisela, Tommaso, Vincenzo, Marco, Luisa, Filomena, Claudia y a todos de la Universidad de Siena-Italia.

A la Mag. Fanny Lazo por sus consejos y ayuda oportuna en todo el proceso de la investigación. A la Mag. Edith Rodríguez por inculcarme la disciplina y el orden en la investigación.

Al Blgo. Javier Cárdenas, sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de esta investigación, gracias también por tus consejos y amistad.

A las Blgas. Claudia Barleta y Katya Zumaeta por su ayuda en un punto muy importante de la tesis, gracias chicas también por su amistad.

A mis colegas y amigos Gustavo Sandoval, Dan Vivas, Pedro Palermo y Julio Mendoza por los momentos compartidos en el laboratorio, su ayuda en la realización de la tesis y por creer que se puede llegar más lejos si uno quiere.

A las amigas de siempre Fanny R, Betty F, Nora R, Fiorella L, Miriam L, Luz H, Guliana G, Marina V, Melissa T, Rocio D.

A los chicos del LBM, si no hubiese a quien enseñar no se investigaría. Y a todos aquellos que la ingrata memoria no me permite hoy mencionar, pero si mañana ayudar, mi sincero agradecimiento.

A CONCYTEC por su apoyo financiero con la Beca de estudio

Y sobre todo gracias a ti Dios Padre por estar siempre a mi lado cuidándome.

ABREVIATURAS

PLA ₂	:	Fosfolipasa A ₂ .
PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	:	Fosfolipasa A ₂ .básica de <i>Lachesis muta</i>
CM-Sephadex C-50	:	Carboximetil Sephadex C-50.
rpm	:	revoluciones por minuto.
Da	:	Daltons.
pI	:	Punto isoelectrico.
mg, µg	:	miligramos, microgramos.
ml, µl	:	mililitros, microlitros.
ml/h	:	mililitros por hora
nm	:	nanometros.
mM, nM, µM	:	milimolar, nanomolar, micromolar.
UTA	:	Unidades totales de actividad
SDS	:	sodio dodecil sulfato.
Tris	:	tris (hidroximetil amino metano).
HCl	:	ácido clorhídrico
PAGE-SDS	:	Electroforesis en gel de poliacrilamida com sodio dodecil sulfato.
TEMED	:	N, N, N, N ´-tetrametil etilen diamino.
EDTA	:	Etilen diamino tetra acético.
PMSF	:	Fenil metil sulfonil fluoruro.
DTT	:	Ditiotreitol.
TLCK	:	Tosyl lisil clorometil cetona.
DH ₅₀	:	Dosis hemolítica media.
DMM	:	Dosis miotóxica mínima.
CK	:	Cretina kinasa.
IU/L	:	Unidades internacionales por litro.
DEM	:	Dosis edemática mínima.
Log.	:	Logaritmo.
Long	:	longitud.
UV	:	ultravioleta.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	5
OBJETIVOS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Reporte de accidentes por serpientes en el Perú.....	5
Figura 2 Serpiente venenosa <i>Lachesis muta</i>	6
Figura 3 Primer paso de purificación de la PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	31
Figura 4 Segundo paso de purificación de la PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	31
Figura 5 Tercer paso de purificación de la PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	32
Figura 6 Determinación del peso molecular y pureza de la PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	36
Figura 7 pH Óptimo de la PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	36
Figura 8 Determinación de la dosis hemolítica media DH ₅₀	42
Figura 9 Actividad hemolítica indirecta en placa de la PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	42
Figura 10 Actividad edemática de la fosfolipasa A ₂ básica de <i>Lachesis muta</i>	44
Figura 11 Actividad miotóxica de PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	46
Figura 12 Antigenicidad de la PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	48
Figura 13 Neutralización de la actividad enzimática de PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	49
Figura 14 Neutralización de la actividad hemolítica de PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	50
Figura 15 Neutralización de la actividad edemática de PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	51
Figura 16 Neutralización de la actividad miotóxica de PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	52
Figura 17 Amplificado de cDNA de la PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	54
Figura 18 Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de la PLA ₂	57
Figura 19 Secuencia génica de la PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	58
Figura 20 Secuencia génica de la PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	59
Figura 21 Ubicación del péptido señal PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	61
Figura 22 Composición de la estructura secundaria de la PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	62
Figura 23 Modelo propuesto de estructura tridimensional de la PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	64
Figura 24 Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de las PLA ₂	66
Figura 25 Árbol filogenético de PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	68

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Cuadro de purificación de la PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	32
Tabla 2 Efecto de algunos iones sobre la actividad de PLA ₂	40
Tabla 3 Efecto de algunos inhibidores sobre la actividad de PLA ₂	40
Tabla 4 Alineamiento de la secuencia nucleotídica la PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	56
Tabla 5 Determinación del péptido señal de PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	60
Tabla 6 Composición de aminoácidos de la PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	63
Tabla 7 Alineamiento de la secuencia proteica de la PLA ₂ básica <i>L.muta</i>	65

RESUMEN

En la presente investigación se estudian las propiedades, bioquímicas, biológicas, inmunológicas y moleculares de una isoforma básica de Fosfolipasa A₂ presente en el veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta* (PLA₂básica*L.muta*). La purificación se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico, filtración y de alta performance; la enzima fue purificada 41,2 veces con un rendimiento de 64%. Se obtuvo una única banda proteica de 14,7 kDa por PAGE-SDS en condiciones reductoras y no reductoras, demostrando ser una proteína monomérica. Su pH óptimo es de 7,8 y es fuertemente inhibida por el PMSF, EDTA y glutatión. En cuanto a su acción biológica, se obtuvo la dosis hemolítica media (DH₅₀) en 4,35µg, la dosis miotóxica mínima (DMM) en 18,96µg/ml y la dosis edemática mínima (DEM) 23,56µg. La enzima no mostró actividad hemorrágica ni acción anticoagulante. Adicionalmente las pruebas de inmunodifusión e inmunolectroforesis revelaron que PLA₂básica*L.muta* es reconocida e inhibida parcialmente por el suero monovalente antilachésico (INS-Perú).

Empleando la metodología de RT-PCR se obtuvo la secuencia completa del cDNA de PLA₂básica*L.muta*, con 445 pb; análisis bioinformáticos indican que la secuencia posee un marco de lectura abierta de 414 nucleótidos que codifica un péptido señal de 16 aminoácidos y una proteína madura de 122 residuos, el peso molecular fue de 13,86 kDa y un *pI* de 8,316. La secuencia aminoacídica, contiene residuos conservados para el sitio catalítico, His48, Asp49, Tyr52 así como para unión al Ca⁺², Tyr18, Gly30 y Gly32. El modelaje tridimensional de la PLA₂, muestra que está formada por tres hélices- α , una lámina- β y un lazo de unión al Ca⁺². PLA₂básica*L.muta* mostró alta homología estructural con otras sPLA₂ de venenos de serpientes. Finalmente, los estudios revelan que la PLA₂básica*L.muta* pertenece al grupo sPLA₂ [Asp⁴⁹] básicas de bajo peso molecular. Este es el primer estudio que correlaciona la estructura y función de una enzima proveniente del veneno de una serpiente peruana.

Palabras claves: Fosfolipasa A₂, Isoenzima, *Lachesis muta*, sitio farmacológico, transcrito.

ABSTRACT

In the present research the biochemical, biological, immunological, as well as molecular properties of a basic isoform of Phospholipase A₂ from venom of peruvian snake *Lachesis muta* (PLA₂Basic*L.muta*), were studied. This enzyme was purified using ion exchange, filtration and high performance chromatographical steps, respectively. The enzyme was purified 41,2 times with a yield of 64%. SDA-PAGE analysis showed a unique protein band of 14,7 kDa under reducing and no reducing conditions indicating that the enzyme is a single polypeptide chain. Furthermore, the enzyme had a optimal pH of 7,8 and was inhibited by PMSF, EDTA and glutation. In relation to its biologic activity, a Medium Hemolytic Doses (DH₅₀) of 4,35µg/tube, Minimum Miotoxic Doses (MMD) of 18,96µg/ml and the Minimum Edematic Doses (MED) of 91,5µg were obtained. For another hand, the PLA₂ didn't show either hemorrhagic or anticoagulant activities, and was recognized and partially inhibited by monovalent antilachesic serum (INS-Perú) by immunodiffusion and immunoelectrophoresis.

Using RT-PCR methodology and bioinformátics analysis the complete cDNA sequence of PLA₂basic*L.muta* with 445 bp and an open reading frames of 414 nucleotides, were obtained, which encodes a peptide signal of 16 amino acids and a matured protein of 122 residues with 13, 86 kDa and a pl value of 8,3, calculated by in silico analysis. The amino acidic sequence contains conserved residues of His48, Asp49, Tyr52 in the catalytic site, as well as Tyr18, Gly30 y Gly32 in the Ca⁺²-binding site. Three-dimensional model of PLA₂basic*L.muta* showed that was conformed by three α-helix, one β-sheet and one Ca⁺²-binding ribbon. PLA₂basic*L.muta* shows a high structural homology with other snake venom phospholipases. Finally, studies reveal that PLA₂basic*L.muta* belongs to the group of lower molecular weigh basic sPLA₂ [asp49]. This work is the first study that correlate the structure and function of a Peruvian snake venom enzyme.

Key words: Phospholipase A₂, Isoenzyme, *Lachesis muta*, pharmacologic site, transcript.

INTRODUCCIÓN

América Latina presenta una amplia diversidad de serpientes, una de ellas es *Lachesis muta*, la serpiente más grande de la subfamilia *Crotalinae*, familia *Viperidae*, la cual se encuentra distribuida en los trópicos forestales lluviosos de América Central y del Sur. En el Perú, “Shushupe” como la nombran popularmente, habita las zonas de selva alta y baja donde el envenenamiento por esta serpiente se da principalmente en la población rural involucrada en faenas agrícolas (Ascencios y Cutti, 1995). El cuadro clínico que se desarrolla en estos casos se asocia con daños locales rápidos y prominentes: diarrea, edema, intenso dolor local, náusea, hipotensión, sangrado, necrosis, signos neurotóxicos, coagulopatías, choque cardiovascular e insuficiencia renal aguda, ocasionando de esta manera un problema de salud.

A pesar que se cuenta con tratamientos, siendo el principal, el uso del suero antiofídico, la progresión del envenenamiento puede ser muy rápida debido a que el veneno presenta complejos enzimáticos con diferentes propiedades físicas, químicas y biológicas (incluyendo los anticuerpos que son producidos para cada uno de estos componentes), razón por la cual en algunas ocasiones los cuadros clínicos son distintos. Entre estos complejos enzimáticos se encuentran las fosfolipasas A₂ (PLA₂), enzimas que presentan diferentes efectos biológicos entre los que se destacan: anti-coagulante, neurotóxico, inhibición de la agregación plaquetaria, hemorrágico, convulsivo, miotóxico, etc. (Kini, 2003). Estas proteínas también están involucradas en procesos fisiopatológicos tales como: reumatismo, osteoartritis, asma, psoriasis, shock séptico y síndrome distrés respiratorio (Touqui y Alaoui-El-azher, 2001; Murakawi y Kudo, 2002).

Las PLAs de venenos de serpientes poseen características peculiares, estas pueden ser catalíticamente inactivas pero biológicamente funcionales, la homología estructural que pueden poseer entre sí no asegura que compartan una actividad biológica similar; son en su mayoría monoméricas, dependientes de calcio, con pesos moleculares que oscilan entre los 10 y 30 kDa, su estructura

terciaria es estabilizada por varios enlaces disulfuros. Otra peculiaridad es la presencia de isoformas de PLA₂ en un mismo veneno con funciones biológicas totalmente distintas por lo que se considera que estas enzimas alcanzaron la máxima diversidad evolutiva dentro de los venenos ofídicos.

Debido a la gran variabilidad de las fosfolipasas A₂ en general y, tomando en cuenta la presencia de isoformas, este trabajo describe el aislamiento, la caracterización estructural, biológica y molecular de una nueva isoforma de PLA₂ presente en el veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*, para permitir una mayor comprensión de su relación estructura-función. Además de evaluar su antigenicidad con el antiveneno, ya que se conocen toxinas que conservan su actividad farmacológica pese a estar formando complejos con los anticuerpos.

La evidencia proporcionada por esta investigación permite inferir algunas características de la PLA₂, tanto a nivel estructural y funcional, permitiendo entender su acción en el proceso de envenenamiento por *Lachesis muta*. De esta manera, se puede plantear mejores estrategias para enfrentar los diversos daños producidos por esta enzima y evaluar su potencialidad como herramienta biotecnológica.

Se trata del primer estudio realizado en el país en el que se compara las características moleculares, bioquímicas y funcionales de una proteína asociada a la toxicidad y que aparece como una isoenzima en el veneno de *Lachesis muta*.

ANTECEDENTES

Desde la antigüedad, los accidentes causados por serpientes venenosas constituyen un problema de salud a nivel mundial. En el Perú, estos accidentes llegan a causar pérdidas de vidas humanas. Cuando no suceden casos fatales, los afectados pueden sufrir una destrucción de tejidos, hasta la pérdida parcial o total de algún miembro (Pesantes, 2000).

En el Perú se pueden encontrar 9 de las 11 familias de serpientes que se conocen y 33 especies ponzoñosas, de las cuales 9 son autóctonas y las 24 restantes son comunes a países vecinos (Carrillo de Espinoza e Icochéa, 1995). De acuerdo a la información proporcionada por la Dirección General de Salud de las Personas del Instituto Nacional de Salud (DGSP-INS), las serpientes venenosas de los géneros *Bothrops* y *Lachesis* son las que más frecuentemente producen accidentes ofídicos (figura 1; INS, 2008).

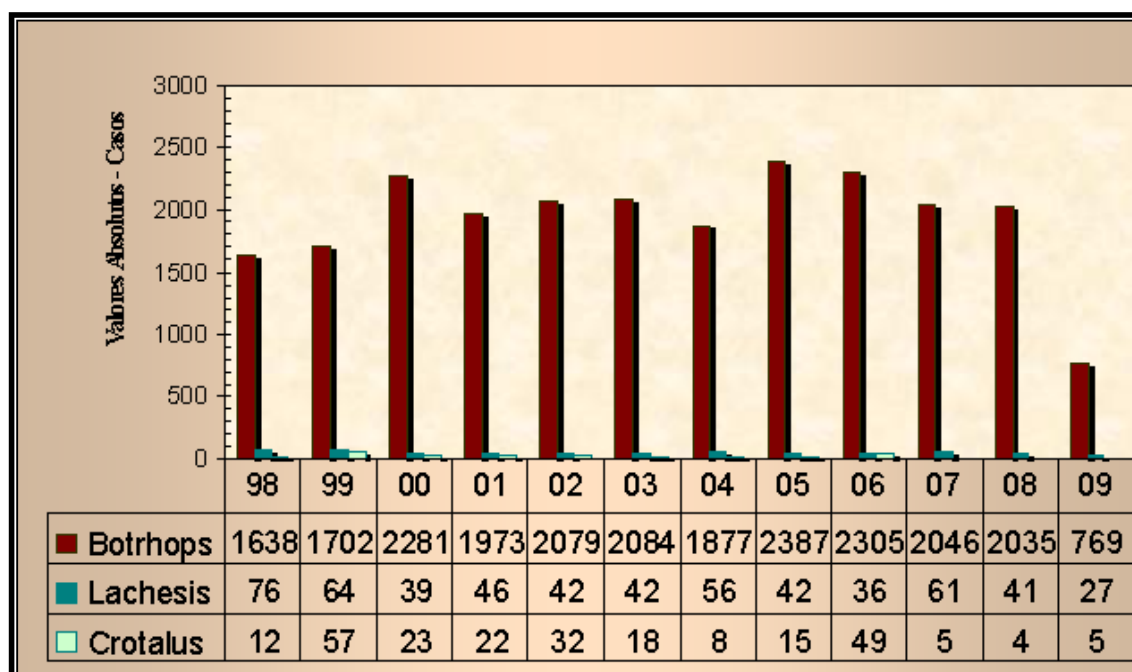


Figura 1. Reporte de accidentes por serpientes en el Perú. Periodo 1998-2009. Fuente estadísticas DGSP-MINSA.

En el Perú, la serpiente *Lachesis muta* habita los bosques tropicales amazónicos, así como el flanco oriental de los Andes de Huánuco, Junín, Loreto, Madre de Dios y Ucayali. Presenta un cuerpo grueso y alargado de color pardo amarillento, vientre crema, diseños romboidales negros en la parte dorsal, cola en punta con escamas espinosas y llegan a medir hasta 4 metros (Ascencios y Cutti, 1995) (Figura 2).



Figura 2. Serpiente venenosa *Lachesis muta* , Familia Viperidae, Subfamilia Crotalinae

Los accidentes lachésicos son clasificados como moderado o graves, por ser serpientes de gran tamaño, considerándose que la cantidad de veneno inoculada es potencialmente mayor. Las acciones principales del veneno lachésico son: proteolítica, coagulante e hipotensora estas son observadas en casos de personas que llegan precozmente a la atención, seguidamente puede producirse un shock y llegar a la muerte (MINSA, 2004).

También se consideran otros factores de variabilidad sintomática la edad de la serpiente, la susceptibilidad del paciente, así como la variedad de enzimas

y toxinas del veneno (MINSA, 2004). Dentro de esta variedad tenemos enzimas similares a trombina, hialuronidasas, proteasas, fosfatasas y fosfolipasas A_2 entre las más importantes (Yarlequé, 2000).

Los sueros antiofidicos o antivenenos han constituido el recurso terapéutico fundamental para el tratamiento de los envenenamientos por mordeduras de serpiente, Calmette produjo el primer “serum antivenimeux” a fines del siglo XIX en Francia, mientras que en el continente americano, el renombrado científico brasileño Osvaldo Vital Brazil fue quien produjo los primeros antivenenos en 1901 trabajando en el Instituto Butantán (Vital, 1987).

En la actualidad los antivenenos son evaluados mediante su capacidad de neutralizar la actividad letal (WHO, 1981); existe la necesidad de desarrollar pruebas alternativas para probar la potencia del antiveneno mediante ensayos *in vitro*, como la hemaglutinación pasiva (Khupulsup *et al.*, 1981), ELISA (Theakston y Reid, 1979) y la neutralización de la actividad de fosfolipasa A_2 (Da Silva y Goulherme, 1982).

En general, las fosfolipasas (EC 3.1.1.4) son enzimas hidrolasas de los fosfolípidos; actúan sobre los enlaces acil-éster de una variedad de fosfoglicéridos, siempre que su configuración química sea la de un sn-glicero 3 fosfato ó la de un sn-glicero 2 fosfato y dependiendo de la zona que hidroliza se le denomina como: fosfolipasa A_1 que separa de modo específico el ácido graso de la posición 1 y la fosfolipasa A_2 el de la posición 2; la fosfolipasa B es una mezcla de los anteriores efectuando la separación sucesiva de los ácidos grasos, la fosfolipasa C hidroliza el enlace entre el ácido fosfórico y la glicerina, mientras que la fosfolipasa D elimina el grupo de cabeza polar dejando el ácido fosfatídico. De acuerdo con las características bioquímicas y el origen celular, las fosfolipasas se clasifican como: citosólicas (cPLA₂), secretoras (sPLA₂) e intracelulares (iPLA₂), (Dennios, 1994). Así mismo las fosfolipasas A_2 secretoras son clasificadas en tres grupos, de acuerdo a su estructura primaria. En el grupo I se encuentran las fosfolipasas de páncreas de mamíferos y venenos de serpientes pertenecientes a la familia Elapidae, el grupo II esta formado por venenos de serpientes de las familia Viperidae, por su parte el grupo III esta

representado principalmente por venenos de abejas (*Apis mellifera*) y venenos de lagartijas (Dufton y Hider, 1983).

Las fosfolipasas A₂ de mamíferos son generalmente no tóxicas ellas juegan un rol importante en la fertilización, contracción muscular, funciones celulares tales como la traducción de señal vía biosíntesis de prostaglandina y leucotrienos (Verheij *et al.*, 1981; Jain y Ferg, 1989; Arita *et al.*, 1991; Dennis *et al.*, 1991; Fry *et al.*, 1992; Kudo *et al.*, 1993; Dennis, 1994). En tanto que las PLA₂ de venenos de serpiente en adición a su posible rol en la digestión de la presa, exhibe un amplio rango de efectos farmacológicos para interferir en procesos fisiológicos normales.

Estas proteínas presentan un amplio rango de pesos moleculares (11 a 31 kDa), punto isoelectrico (4 a 10pI) y enlaces disulfuros (6-8), esta alta cantidad de enlaces le confiere una gran estabilidad en su estructura tridimensional, mientras que su pH óptimo se presenta en un medio alcalino. También pueden incrementar su actividad enzimática al unirse a iones metálicos como Ca⁺, Fe⁺, Mg⁺.

Se han encontrado en muchas especies isoformas de esta enzima con similaridad de peso molecular y pI presentando homologías estructurales de un 40 – 99% de identidad en sus secuencias de aminoácidos y significativa similaridad en su estructura tridimensional, así sus diferencias funcionales no son fácilmente correlacionadas a sus estructuras. Estas enzimas estructuralmente presentan 2 sitios importantes; el primero, común a todas las enzimas, su sitio catalítico o enzimático y dependiendo del aminoácido que se ubica en la posición 49, parte principal del sitio catalítico, se clasifican en a) fosfolipasas enzimáticamente activas, que presentan un residuo de ácido aspártico en la posición 49 (D-49) y b) enzimas catalíticamente inactivas o débilmente activas con una lisina en posición 49 (K-49). El segundo sitio es el farmacológico o biológico, se puede localizar en distintas zonas de la estructura y puede ser específico o no, además son los que determinan el efecto biológico como de miotoxicidad, hemólisis, neurotoxicidad, etc. Hay evidencia significativa que no es necesaria que la PLA₂ sea catalíticamente activa para producir la

miotoxicidad, el cual es el efecto biológico más potente de las PLA₂ (Díaz y Gutiérrez, 1997).

También se considera que cada isoforma de la enzima presenta un efecto específico así tenemos que las isoformas de fosfolipasa de *Vipera russelli* al ser inyectadas intraperitonealmente exhiben distintos efectos: una induce hemorragia en el hígado y riñón (Vishwanath *et al.*, 1985) otra daña los pulmones causando hemorragia mientras que un tercero produce síntomas neurotóxicos letales en ratones (Kasturi y Gorda, 1989). Fue de esta forma que se llegaron a identificar inicialmente hasta 10 isoformas de fosfolipasas cada una con diferente acción biológica, en una misma especie de serpiente.

Uno de los primeros efectos biológicos investigados, fue el efecto hemolítico provocado por el veneno de *L. muta*, el estudio sobre la estructura y fisiología de la fosfolipasa A₂ sobre eritrocitos permitieron comprender la actividad hemolítica de los venenos, sirviendo estos reportes como herramientas para localizar fosfolípidos. Slotta y Fraenkel-Conrat (1938-1939), reportaron el primer aislamiento de una fosfolipasa A₂ del veneno de *Crotalus durissus terrificus*, a la cual denominaron crotoxina, con actividad neurotóxica. En la actualidad se han aislado, purificado y secuenciado alrededor de 100 fosfolipasas de venenos con actividades miotóxica en *Crotalus viridis viridis* (Ownby *et al.*, 1997), anticoagulante en *Vipera aspis* (Boffa *et al.*, 1982); citolítica e inducción de edema en *Naja naja* (Rudrarrimaji y Gowda, 1998) inhibición de la agregación plaquetaria, hipotensión entre otras (Kini y Evans, 1997).

Los usos biotecnológicos importantes de la fosfolipasa A₂ derivan de sus efectos bactericidas, anti-VIH, anti-tumoral, anti-parasitaria y anti-malaria (Soares y Giglio, 2003), resaltando este último por su importancia en salud. Se ha reportado que las fosfolipasas A₂ de abejas y de la serpiente cascabel (Moreira *et al.*, 2002; Zieler *et al.*, 2001) muestran un efecto inhibitorio del ciclo biológico de *Plasmodium sp.*

Todas estas características hacen interesante continuar con el estudio de estas enzimas. Grupo de investigadores de Brasil purificaron dos isoformas de fosfolipasas A_2 de *L. muta* brasileñas ambas de naturaleza ácidas, la primera LM-PLA₂-I presenta un efecto miotóxico y el segundo LM-PLA₂-II con una potente agregación plaquetaria como edemática (Fuly *et al.*, 2002), mientras que usando modelos de inhibición producidos por inhibidores de PLA₂ aislados de plasmas de otras serpientes, revelaron la presencia de cinco isoformas de PLA₂ en *L. muta*, correspondiendo a cuatro fosfolipasas ácidas y una básica (Fortes-Díaz *et al.*, 1999). Por otro lado Damico *et al.*, (2005a) reportaron 2 fosfolipasas de naturaleza básica.

En Perú, los primeros estudios en fosfolipasa A_2 de la serpiente *L. muta* fueron realizados por Woll P., en 1976, realizando una purificación parcial a través de precipitación isoeléctrica, posteriormente Mejia *et al.*, en 2006 caracterizó parcialmente la enzima resultando ser una proteína de naturaleza ácida, con un peso molecular de 19 kDa. En el 2009 Inga, purificó y evaluó los efectos biológicos presentando esta enzima un fuerte efecto hemolítico indirecto y anticoagulante, además de ser inmunogénica a pesar de su bajo peso molecular. En el mismo año Jiménez, realizó el primer estudio molecular obteniendo el DNA complementario (cDNA) de la PLA₂ de *Lachesis muta* peruana (Jiménez, 2009).

Es evidente que la fosfolipasa A_2 de la serpiente *L. muta* presenta varias isoformas. En el presente trabajo se caracterizó a nivel bioquímico, biológico y molecular una nueva isoforma de esta enzima.

OBJETIVOS

A. Objetivo General

- Estudiar la estructura, propiedades bioquímicas, función biológica y las secuencias génica y aminoacídica de una fosfolipasa A₂ del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*, así como su interacción con el antiveneno lachésico.

B. Objetivos Específicos

- Establecer el procedimiento de purificación de la isoforma básica de PLA₂ presente en el veneno de *L. muta*.
- Calcular el pH óptimo y peso molecular de la enzima.
- Determinar la acción de agentes químicos sobre la actividad de PLA₂ para su caracterización bioquímica.
- Establecer la acción biológica en la que está involucrada la proteína en estudio.
- Evaluar la antigenicidad y grado de neutralización frente al suero antilachésico.
- Identificar, amplificar y secuenciar el gen de la isoenzima de la PLA₂.
- Establecer la secuencia aminoacídica de la enzima en estudio a partir de su secuencia génica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

a) Material Biológico

- Veneno

Se empleó veneno obtenido de la serpiente peruana *Lachesis muta* procedente de Satipo, departamento de Junín y mantenida en cautiverio en el serpentario Oswaldo Meneses de la UNMSM-Lima. El veneno extraído por presión manual, fue liofilizado y conservado a -8°C.

- Antiveneno

El antiveneno utilizado fue el suero antilachésico monovalente líquido, producido por el Instituto Nacional de Salud-Lima (INS). Cada vial contiene 10ml de antiveneno que neutralizan no menos de 25mg del veneno de *Lachesis muta*. Para los ensayos de comparación se utilizaron ampollas de antiveneno vigentes (Lote: 00300183, Fecha de expiración: agosto 2009). Todos los experimentos realizados con el antiveneno fueron entre Junio de 2008 a Mayo de 2009.

- Animales de experimentación

Se emplearon ratones albinos cepa Balb C machos (18 a 22 g) criados en el bioterio del Instituto Nacional de Salud.

- Material sanguíneo,

Se utilizó plasma humano para los ensayos de coagulación y para los de hemólisis se utilizaron glóbulos rojos humanos lavados con buffer isotónico.

b) Material de Laboratorio

Sustratos:

- Emulsión de lipoproteína de yema de huevo.
- Fosfatidilcolina.
- Gel de agar sangre al 1,5%.

Agentes Inhibidores y Activadores:

- Fenil metil sulfonyl fluoruro (PMSF).
- Ditioneitol (DTT).
- Iodoacetato.
- Etilen diamino tetraacético (EDTA).
- 2-Mercaptoetanol.
- Ácido glutámico, Ácido aspártico, cisteína y glutatión.
- Ca^{2+} y Mg^{2+} bajo la forma de cloruros.

Estándares de peso molecular:

- Albúmina Sérica Bovina (66000 Dalton).
- Ovoalbúmina (45000 Dalton).
- Anhidrasa Carbónica (29000 Dalton).
- Lisozima (14300 Dalton).
- Marcadores de peso molecular 1kb DNA Fermentas.
- Marcadores de peso molecular 100bp DNA Promega.

Electroforesis:

- Acrilamida.
- Bis acrilamida.
- Dodecil sulfato de sodio (SDS).
- Tetra etil metilen diamino (TEMED).
- Persulfato de amonio.
- Azul brillante de Coomassie.
- Azul de bromofenol.

- Agarosa.
- Bromuro de etidio.
- Solución decolorante (metanol, ácido acético, agua).

Resinas Cromatográficas

- CM- Sephadex C-50.
- Sephadex G-50.

Buffers y otros:

- Acetato de amonio 0,05M pH 5,0.
- Tris- HCl a varias molaridades y valores de pH.
- Solución salina (NaCl 0,9%).
- Citrato de sodio 3,8%.
- Tris-HCl 0,1M con Cloruro de calcio 0,1M pH 7,6.
- Gel de agarosa al 1%.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu.
- Buffer isotónico (glicina 0,1M, NaCl 0,9% pH 7,3).
- Buffer fosfato salino PBS 0,02M, pH 7,4.
- Buffer de corrida (Tris 0,1M, SDS 0,1%, glicina, pH 8,3).
- Buffer de stacking (Tris 0,25M, SDS 0,2% pH 6,8.).
- Buffer de resolución (Tris 0,75M, SDS 0,2% pH 8,8).
- Buffer muestra (Tris 0,06M, SDS 0,05%, glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0,05%).
- Buffer Tris Borato EDTA (TBE) 0,5X.
- Acetonitrilo de 0-60%.
- Ácido tricloroacético 0,1%.
- Tubos de 6 x 0,5, 13 x 1,0, 15 x 1,2 cm.
- Tubos Amicon Ultra-4 con filtro para centrifugar para 10K-NMWL.
- Placas petri.
- Columnas cromatográficas de 44 x 1,2 cm.
- Pipetas automáticas Eppendorf 0,5-10ul, 10-100ul, 1000ul, 0.5-5 ml, Boeco 20-200ul.

- Kit de Creatina Kinasa CK-UV (Sigma).
- Kit Total RNA purification (AMRESCO).
- Kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche).
- Kit Platinum[®]Taq DNA Polymerase (Invitrogen).

c) Equipos

- Equipo para cromatografía líquida de alta performance (HPLC) Agilent 1100, Bondapack columna C-18.
- Colector automático de Fracciones LKB-Pharmacia
- Potenciómetro digital Orion Research.
- Espectrofotómetro Shimadzu UV.
- Fotocolorímetro Spectronic Bausch & Lomb.
- Balanza Analítica Ainsworth.
- Centrífugadora Sorvall Instruments Modelo Easy Spin.
- Microcentrífuga Denver Instrument.
- Liofilizador Labconco.
- Baño de temperatura Memmen.
- Equipo de electroforesis vertical en placa Techware.
- Equipo de electroforesis horizontal Wide Mini-Sub Cell GT System Bio-Rad.
- Fuente de poder para electroforesis Duostat Beckman.
- Cámara Transiluminador Polaroid.
- Cámara para inmunoelectroforésis Gelman Sciences.
- Termociclador GeneAmp[®] PCR System 9700.

2. MÉTODOS

2.1 Purificación de la Enzima por Cromatografía.

Para obtener la enzima se utilizó el método de Mejía *et al* (2006) modificado. Se utilizó 100 mg de veneno los cuales fueron disueltos en buffer acetato de amonio 0,05 M a pH 5 y centrifugados a 3000 rpm x 15 min. para eliminar contaminantes insolubles. El sobrenadante fue colocado en una columna cromatográfica de intercambio catiónico, equilibrado con buffer acetato de amonio 0,05 M a pH 5. Se colectaron fracciones de 3 ml a razón de 10ml/h a temperatura ambiente y se determinó la cantidad de proteína por absorbancia a 280nm. La elusión de las proteínas retenidas se realizó por una gradiente de NaCl de 0,3M a 0,6M. Las fracciones que presentaron mayor actividad de fosfolipasa A₂ fueron juntadas y concentradas por centrifugación con los tubos AMICON Ultra-4 a 10000 rpm por 10 minutos, para la siguiente etapa de purificación.

La proteína activa fue aplicada a una columna de filtración molecular, equilibrada con el buffer ya mencionado bajo las mismas condiciones. Se colectaron fracciones de 1,5 ml, las fracciones que contenían la enzima fueron reunidas y concentradas, una cantidad fue pasada por un HPLC en una columna C-18, eluído a razón de 1µl/2min con una gradiente de acetonitrilo y ácido tricloroacético.

2.2 Caracterización bioquímica

2.2.1 Cuantificación de Proteínas.

Se cuantificó mediante dos métodos:

a) *Método de absorción de luz ultravioleta.*

Se utilizó el método de Warburg y Christian (1941) midiendo la absorbancia de luz UV a 280nm en un espectrofotómetro para

determinar la densidad óptica de una solución del veneno crudo a 1mg/ml, así como de las fracciones colectadas en las cromatografías.

b) *Método de Lowry.*

Se fundamenta en la formación de una mezcla coloreada con el reactivo de Folin-Ciocalteu 1:6 (RFC), solución alcalina que contienen carbonato de sodio al 4%, sulfato de cobre al 2% y tartrato de sodio y potasio al 4% (100:1:1); se colocó diferentes cantidades de la muestra más 2 ml de solución alcalina incubándose a 37°C durante 15 minutos, para luego adicionarle 0,5ml de RFC, después de 30 minutos se cuantificó a 660 nm en un fotocolorímetro provisto de un fototubo y filtro infrarrojo (Lowry et al., 1951).

2.2.2 Actividad de Fosfolipasa A₂.

Fue ensayada de acuerdo a 2 métodos:

a) *Método de retardo de la coagulación de la yema de huevo (Vidal y Stoppani 1971).*

Usando una emulsión de yema de huevo al 45% en buffer Tris-HCl 10 mM con Ca₂Cl 10 mM. Se evaluó el tiempo de retardo de la coagulación de la emulsión a la que se le añadió la enzima en cantidades adecuadas, se incubó la mezcla por 15 minutos a 37°C, para luego ser transferidos a un baño de agua hirviente, midiéndose el tiempo de coagulación con respecto a un blanco. La actividad específica fue calculada en base al tiempo de retardo de la coagulación de la lipoproteína de la yema de huevo por minuto y por miligramo de proteína.

b) *Método espectrofotométrico (De Oliveira y Palma, 1998).*

Para esta prueba se empleó una mezcla que contenía Fosfatidilcolina, Ca₂Cl, Rojo de Fenol, Triton X-100 y Buffer Tris-HCl 0,01M. Esta solución fue introducida en una celda de 3 ml e incubada

a 37°C por 5min luego se le agregó la enzima en estudio y se evaluó el cambio en la densidad óptica de la mezcla a 558 nm. La actividad enzimática se expresa como cambio de absorbancia por minuto por miligramo de proteína.

2.2.3 Evaluación de la Pureza y Peso Molecular.

Para la evaluación de la pureza de la proteína así como la determinación de su peso molecular, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) en condiciones reductoras (con 2β-mercaptoetanol) y no reductoras de acuerdo al método de Laemmli (1970) con un gel de resolución al 12% y un gel de stacking al 4% manteniendo la corrida a voltaje constante (100 voltios) durante 1 hora aproximadamente, el revelado de las bandas fue con azul brillante de Coomassie al 0,1% por 30 minutos y lavados con solución decolorante (metanol 25: ácido acético 8: agua 67) hasta evidenciar las bandas de proteína. Se usaron como marcadores de peso molecular: albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y lisozima (14,3 kDa).

2.2.4 Evaluación del pH óptimo.

Para la evaluación del pH óptimo de la enzima se usó buffer tris HCl 0,01M con un rango de pH de 7 a 9 con intervalos de 0,2 unidades de pH. Para esta prueba se preparó el sustrato en cada uno de los buffers midiéndose a continuación la actividad de la enzima.

2.2.5 Efecto de algunos iones, inhibidores enzimáticos y aminoácidos

Se exploró el efecto de dos iones divalentes como son los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} , bajo la forma de cloruros, a concentraciones finales de 0,1,

0,5, 1 y 5 milimolares tanto independientemente como en conjunto. Para ello se incubaron con la enzima a 37°C por 10 minutos para luego ser agregados al sustrato y medir la actividad enzimática.

Se analizaron los efectos de inhibidores como fenil metil sulfonyl fluoruro (PMSF), ditioneitol (DTT), iodoacetato, etilen diamino tetraacético (EDTA), 2-mercaptoetanol, así como de algunos aminoácidos tales como ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína y glutatión a concentraciones finales de 2,5, 5, 10 y 20 mM, los cuales se preincubaron con la enzima a 37°C por 10 min. Midiéndose luego la actividad enzimática por el método de Vidal y Stoppani (1971).

2.3 Caracterización biológica

Para la caracterización biológica se evaluaron las actividades: hemolítica (directa e indirecta), Edemática, hemorrágica, anticoagulante y miotóxica, cada uno de los ensayos fue realizado por triplicado.

2.3.1 Determinación de la Actividad Hemolítica

Se determinó por el método de Condrea *et al* (1964), colectándose 10ml de sangre humana venosa en tubos citratados al 3,8% los cuales fueron centrifugados a 1000rpm x 15minutos. Se retiró el plasma (sobrenadante) para la prueba de acción anticoagulante y el paquete de glóbulos rojos fue resuspendido y lavado con NaCl al 0,9% pH 7,3, finalmente fue resuspendido en buffer isotónico.

a) Actividad Hemolítica Directa.

Se preparó una mezcla que contenía: 0,8ml de buffer isotónico, 0,1ml de glóbulos rojos lavados (GRL) y 0,1ml de la enzima, la mezcla fue incubada a 37°C por 2 horas deteniendo la reacción con la solución fría (NaCl al 0,9% pH 7,3 con EDTA 1mM) se centrifugó a 1000 rpm por 5min y se pasó a leer su absorbancia a 540nm. El grado de

hemólisis total se expresa como porcentaje de hemoglobina contenida en 0,1ml de GRL y hemolizados con 5,9ml de agua destilada.

b) Actividad Hemolítica Indirecta.

Se preparó una mezcla que contenía: 0,7 ml de buffer isotónico, 0,1ml de GRL, 0,1ml de lipoproteína de yema de huevo al 6,4% y 0,1ml de la enzima. Se incubó a 37°C por 2 horas y se detuvo la reacción con 5ml de la solución detenedora fría anteriormente mencionada procediéndose de la misma manera para la lectura y análisis de la actividad.

Se determinó la Dosis Hemolítica media (DH₅₀), la cual se define como la concentración de veneno en µg/ml que es capaz de lizar el 50% de los glóbulos rojos, bajo las condiciones experimentales empleadas (Castañon *et al.*, 1993). Para ello se elaboró una curva dosis-respuesta de µg de veneno vs el % de hemólisis, empleando una escala logarítmica para la dosis de veneno y una escala milimétrica para el % de hemólisis (World Health Organization, 1981).

c) Actividad hemolítica Indirecta en placa

Se preparó una solución de agar agar al 1,5% final en PBS a pH 7,4, GRL al 3%, yema de huevo al 5% y cloruro de calcio 10mM. La mezcla se vertió a una placa Petri estéril, luego de su gelificación se realizaron pocillos con ayuda de un sacabocados y se colocaron las muestras del veneno como de la enzima en concentraciones adecuadas para compararlas. Se hicieron observaciones a las 0, 12 y 24 horas para determinar la presencia de un halo hemolítico el cual fue medido en centímetros (Haberman y Hardt, 1972., Gutiérrez *et al.*, 1988a).

2.3.2 Determinación de la Actividad Edemática.

Fue evaluada por el método descrito por Yamakawa *et al.* (1976), se emplearon grupos de 6 ratones machos de 18-22g los cuales fueron inyectados en la pata posterior derecha región subplantar con 0,05ml de fosfolipasa A₂ purificada a diferentes concentraciones y en la pata posterior izquierda en la misma zona se inyectó solución salina (control negativo). Después de 3 horas se sacrificó a los animales por dislocación cervical, se retiraron las patas, las cuales fueron pesadas comparándolas con su respectivo control evaluandose el efecto edemático por la diferencia de pesos.

La dosis edemática media (DEM) se expresa en µg de proteína capaz de producir una diferencia de peso entre el miembro tratado y no tratado, equivalente al 30%. Para ello se realizó una curva dosis-respuesta por regresión lineal (µg de veneno vs % de la diferencia de peso producido), empleando una escala logarítmica para la dosis de veneno y una escala milimétrica para el % de peso (World Health Organization, 1981).

2.3.3 Determinación de la Actividad Hemorrágica.

Se realizó según el Método de Kondo *et al.* (1960), donde grupos de 6 ratones (machos, 18-22g) fueron inyectados intraperitonealmente con 0,1ml de la muestra, se observó a los animales anotando su comportamiento por un lapso de 2 horas, luego fueron sacrificados por dislocación cervical. Con mucho cuidado se abrió y se retiró la piel tomando en cuenta el lado por donde se inyectó, para determinar el área hemorrágica formada, si el daño en la piel es esférico se mide el diámetro de la lesión, si el daño presenta una forma irregular se mide el tamaño del área hemorrágica dibujándolo en papel milimetrado transparente.

Se determina el diámetro de la lesión hemorrágica mediante el siguiente cálculo:

$$\text{Diámetro} = 2 \times \sqrt{\frac{\text{área hemorrágica}}{\pi}}$$

La actividad hemorrágica se expresa como la dosis hemorrágica mínima (DHM), definida como la menor cantidad de veneno o enzima que induce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro, para ello se prepara una curva dosis-respuesta (μg de veneno vs mm diámetro de lesión hemorrágica), empleando una escala logarítmica para la dosis de veneno y una escala milimétrica para el diámetro de la lesión

2.3.4 Determinación de la Actividad Anticoagulante.

Se determinó por el método descrito por Yarlequé *et al.* (1989). La mezcla de reacción contenía 0,2ml de plasma humano y 0,1ml de la enzima purificada en tubos de 10 x 75, se incubaron a 37°C por 5 minutos para luego agregarles 0,1ml de Cl_2Ca 25mM midiéndose el tiempo de recalcificación o coagulación.

La actividad anticoagulante se determinó por el retardo en la coagulación o la incoagulabilidad del plasma con respecto al tiempo de coagulación del blanco, es decir, al tiempo de recalcificación.

2.3.5 Determinación de la Actividad Miotóxica.

La actividad miotóxica fue evaluada a través de la prueba de Creatina Kinasa (CK) estandarizada por Gutiérrez *et al.* (1980), la cual fue llevada a cabo usando el kit cinético de Sigma CK-UV. Se utilizaron grupos de 4 ratones albinos de 18-22g de peso. Se les inyectó 0,1ml de la enzima purificada a diferentes concentraciones en el músculo gastrocnemius de la pata derecha, se usó como control negativo

0,1ml de PBS 0,15M y como control positivo 0.1ml de veneno total de *Lachesis muta* a 1mg/ml. Después de 2 horas se colectó la sangre de la cola en capilares con anticoagulante. Se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm para separar el plasma. Para la mezcla de reacción se usaron 20 µl de plasma citratado con 1ml de kit CK midiéndose el cambio de absorbancia a 340nm.

La actividad fue expresada en IU/l, una unidad es la resultante de la fosforilación de 1mmol de creatina/min a 37°C. Para la determinación de la Dosis Miotóxica Mínima (DMM) se preparó una curva dosis-respuesta por regresión lineal (µg de veneno vs actividad de CK en plasma), empleando una escala logarítmica para la dosis de veneno y una escala milimétrica para la actividad de CK. Se determinó la dosis de veneno en la que la actividad CK plasmática corresponde a 4 veces la actividad de CK del plasma de los ratones inyectados con solución salina, correspondiendo esta dosis a la DMM (World Health Organization., 1981)

2.4 Pruebas inmunológica y de neutralización.

2.4.1 Inmunodifusión directa (IDD).

La prueba se llevó a cabo sobre geles de agarosa al 1% las cuales fueron disueltas en buffer fosfato salino (PBS) 0,15M a pH 7,0, Luego fue extendida en láminas portaobjetos, dejándose gelificar para posteriormente, realizar 3 pocillos equidistantes con la ayuda de un sacabocado. Se colocó en el pocillo central 10µl de la enzima purificada y en los laterales, el suero. Paralelamente también se hicieron pruebas con láminas conteniendo veneno crudo. La difusión se realizó en cámara húmeda por 48 horas a temperatura ambiente y luego las láminas fueron lavadas consecutivamente con citrato trisódico al 5%, NaCl al 0,9% y agua destilada. Después fueron

teñidas con azul brillante de Coomasie al 0,1% se decoloraron con la solución decolorante (usada en la electroforesis) y finalmente se secaron en una estufa a 37°C por 24 horas (Ouchterlony y Nilsson, 1967).

2.4.2 Inmunoelectroforesis (IEF).

Se realizaron experimentos con la finalidad de analizar las reacciones antígeno-anticuerpo entre el veneno crudo de *L. muta* y la enzima purificada con el respectivo antiveneno. Estas fueron preparadas en láminas cubiertas con agarosa al 1% en forma similar a la realizada para inmunodifusión. Se hicieron orificios de 1 x 4mm en la agarosa gelificada a ambos lados de una canaleta central de 1 x 56mm, se realizó la IEF en cubetas adecuadas en buffer glicina 0,05M pH 8,3.

Se aplicó una corriente de 4 mA/lámina por una hora, se tuvo como indicador de corrida al azul de bromofenol en las muestras. Terminada la corrida, se removi6 el gel de la canaleta central y se aplicó el suero antilachésico después las láminas se colocaron en un recipiente húmedo a temperatura ambiente y estéril por 48h hasta visualizar los arcos de precipitación. La tinción y el secado se realizaron en condiciones similares a la inmunodifusion Ouchterlony y Nilsson, 1967).

2.4.3 Ensayo de neutralización para la actividad enzimática

Para estas pruebas se utilizaron mezclas que contenían 50µl de la enzima en estudio con diferentes concentraciones de suero equivalentes a ½, 1 y 2 dosis neutralizantes de suero antilachésico monovalente (INS-Perú), las mezclas fueron preincubadas a 37°C por

30 minutos. Se procedió a probar la actividad de fosfolipasa empleando 50µl de la mezcla.

Las cantidades de antiveneno neutralizante para todas las pruebas, fueron elegidas en base a la indicación de la ampolla que señala que 10ml de dicho suero neutralizan 24mg de veneno lachésico.

2.4.4 Ensayo de neutralización para la actividad hemolítica.

Para evaluar la neutralización de esta actividad se realizó por el método de Haberman y Hard, (1972) modificado por Gutiérrez *et al.*, (1988a), empleando placas de agar sangre y la DH_{50} como control positivo representando el 100%.

Se preparó una solución de agar al 1,5% final en PBS a pH 7.4, glóbulos rojos lavados al 3%, yema de huevo al 5% y cloruro de calcio 10mM. Luego de su gelificación se hicieron pocillos con ayuda de un sacabocados y se colocaron las muestras del antiveneno y la enzima preincubadas a 37°C por 30 minutos a concentraciones equivalentes a $\frac{1}{2}$, 1 y 2 dosis, se evaluó a las 12 y 24 horas observándose el grado de neutralización por la reducción del halo de hemólisis al compararlo, con el halo que forma el veneno crudo y/o la enzima purificada, considerándolos como el 100% de hemólisis.

2.4.5 Ensayo de neutralización para la actividad edemática.

Se prepararon mezclas que contenían la enzima en estudio con concentraciones de suero equivalentes a $\frac{1}{2}$, 1 y 2 dosis neutralizantes, las mezclas fueron preincubadas a 37°C por 30 minutos. Se emplearon 50µl de la mezcla y se inyectaron en la almohadilla plantar de las patas posteriores de los ratones como en la

determinación de la actividad edemática. Después de 3 horas se sacrificó a los animales, se retiraron las patas las cuales fueron pesadas comparándolas con su respectivo control negativo (solución salina) y un grupo de ratones que son los controles positivos considerándose la DEM, se evaluó el efecto neutralizante en porcentaje de reducción del edema.

2.4.6 Ensayo de neutralización para la actividad miotóxica.

Para evaluar la capacidad neutralizante del suero antilachésico frente al efecto miotóxico se prepararon mezclas que contenían la enzima en estudio con concentraciones de suero equivalentes a $\frac{1}{2}$, 1 y 2 dosis neutralizantes, las mezclas fueron preincubadas a 37°C por 30 minutos. Se usaron 50µl de la mezcla y se inyectaron en el músculo gastrocnemius según el método modificado por Gutiérrez et al., (1980). Se consideró como control positivo y 100% la DMM, se evaluó el efecto neutralizante en porcentaje de reducción.

2.5 Caracterización Molecular

2.5.1 Diseño de primers

Para sintetizar primers específicos y amplificar los genes de la fosfolipasa A₂ se realizó una revisión de artículos científicos de clonaje de genes de PLA₂ de venenos así como de la base de datos de GenBank, obteniendo secuencias nucleotídicas del gen de PLA₂ procedentes de transcritos de serpientes, estas secuencias fueron descargadas en formato FASTA y se compararon por alineamiento múltiple usando el programa Clustal X y Bioedit, para el diseño se

consideró, la longitud de cebadores, temperatura de hibridación, porcentaje de GC mayor a 50%, incluir el péptido señal para futuras clonaciones y expresión de la proteína, degeneración de algunos nucleótidos para una mayor probabilidad de amplificado en base al alineamiento múltiple.

2.5.2 Extracción y purificación de ARN

Se extrajo 300 µl de veneno fresco sin sacrificar a la serpiente, inmediatamente se purificó el ARN total con reactivos libres de ribonucleasa empleando el kit “Total RNA Purification” (AMRESCO) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, seguidamente se procedió a la síntesis de cDNA empleando la metodología de Reacción en Cadena de la Polimerasa por Transcriptasa Reversa (RT-PCR).

2.5.3 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de los cDNA se empleó el kit “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis”, colocando en un tubo de PCR en frío, 7 µl de RNA purificado, 1 µl de primer “anchored-oligo(dT)₁₈”, 1 µl de primer “random hexámero” y 4 µl de agua grado PCR. Se denaturó la mezcla calentando por 10 min a 65°C, se detuvo la reacción por enfriamiento brusco; se continuó agregando 4µl de buffer de reacción, 0,5µl de inhibidores de RNasa, 2µl de deoxinucleótidos y 0,5µl de la transcriptasa reversa. Se incubó la mezcla por 10 min a 25°C seguido de 60 min a 50°C, se inactivó la transcriptasa reversa por calentamiento a 85°C por 5 min y se colocó el tubo en frío para guardarlo de -15°C a -25°C para su posterior amplificación.

2.5.4 Amplificación del gen de la fosfolipasa

Del cDNA sintetizado se usó 1µl para cada reacción PCR en un volumen final de 25 µl. La mezcla de reacción contenía: 50 mM MgCl₂, 10x de buffer PCR, 2 mM de un mix de dNTP, 20 pmoles de cada primer, agua grado PCR y 1,5 µl de Taq DNA polimerasa, kit Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Las condiciones de cada ciclo de reacción programadas en un termociclador fueron: un ciclo de desnaturalización 95° por 5min; seguido por 32 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 seg., hibridación 60°C por 1 min y polimerización a 72°C durante 1 min y finalmente se incubó a 72°C por 7 min. En todos los casos se consideró controles negativos de la reacción de PCR sin añadir cDNA molde. Los productos de PCR obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% en buffer TBE 0,5X corridos a voltaje constante de 75 V. Posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron con la cámara Polaroid. La cuantificación del ADN obtenido se realizó por espectrofotometría a 260 nm.

2.5.5 Secuenciación y Análisis.

La secuenciación de los productos amplificados se realizó por solicitud de servicios a la casa comercial Invitrogen. Para el análisis de las secuencias de nucleótidos obtenidas se utilizó los siguientes softwares de libre acceso:

- Genbank: para la obtención de secuencias nucleotídicas de fosfolipasas A₂ de venenos de serpientes.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- BLAST: para encontrar regiones de similaridad para secuencias nucleotídicas y aminoacídicas.
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

- ClustalX: para alineamiento de múltiples secuencias comparando cada secuencia con todas las demás se construye una matriz de distancias, en la que se refleja la relación de cada secuencia con las demás.
- BoxShade: se empleo para editar las secuencias alineadas.
(http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).
- ORF Finder: se empleó para ubicar los posibles marcos de lectura abierta y conocer la longitud de la proteína “Open Read Frame”.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).
- Traslate tool: empleado para traducir la secuencia nucleotídica a aminoacídica. (<http://ca.expasy.org>).
- SignalP: empleado para el reconocimiento del péptido señal.
(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).
- PHDPBIL: para la determinación de la estructura secundaria de la enzima en estudio.
(http://npsa-pbil.icp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_phd.html).
- Protparam: empleado para la obtención de datos bioquímicas *in silico*
(<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>).
- Cn3D4.1: utilizado para la aproximación de la estructura tridimensional de la PLA₂básica *L.muta*, empleando un modelo de fosfolipasa ya conocido.
- MEGA5: se empleo para la construcción de un árbol filogenético para la enzima.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Purificación de la Enzima por Cromatografía

Como ya se ha mencionado es importante el estudio de las PLA₂ por su implicancia en el envenenamiento ofídico, requiriéndose la obtención de la enzima pura como primer paso. La purificación de la enzima constó de tres pasos cromatográficos uno de intercambio iónico seguido por una de filtración molecular y un tercer paso por HPLC.

En el primer paso (Figura 3) se empleó una resina de CM-Sephadex C-50, por esta columna se obtuvieron 4 picos de proteína, eluidos con el buffer de corrida en condiciones isocráticas, que representan en conjunto el 39,58% del total de la proteína colocada. Se obtuvieron adicionalmente 3 picos al eluir con el buffer conteniendo NaCl al 0,3M representando estos el 27,79% y finalmente al colocar buffer más NaCl al 0,6M, se evidenciaron 2 picos correspondiendo al 22,39%. Entre estos dos últimos picos se encontró la mayor actividad de PLA₂ la cual representa el 14,95% del total de proteína (tabla 1).

Al realizar el segundo paso cromatográfico (figura 4), empleando una resina Sephadex G-50, se logró resolver 2 picos encontrándose la enzima en el primer pico que representa el 1,83% del total de proteína, con un rendimiento del 51,5% y una purificación de 28,1 veces (tabla 1). Por último al pasar por una HPLC (Figura 5), se logró obtener la proteína pura, con un rendimiento final de 63,8% y una purificación de 41,2% (tabla 1).

Los estudios de la fosfolipasa A₂ para *Lachesis muta* se iniciaron en 1976 con Woll, quien realizó una purificación parcial de la enzima empleando precipitación isoeléctrica pH 4,5 así como tratamiento térmico a 100°C, obteniendo una purificación de 3 veces. Más adelante y empleando cromatografías de filtración e intercambio iónico, Mejia *et al.*, (2006) lograron obtener una purificación parcial de la enzima y en el 2009 se logró purificarla 55,3 veces (Inga, 2009).

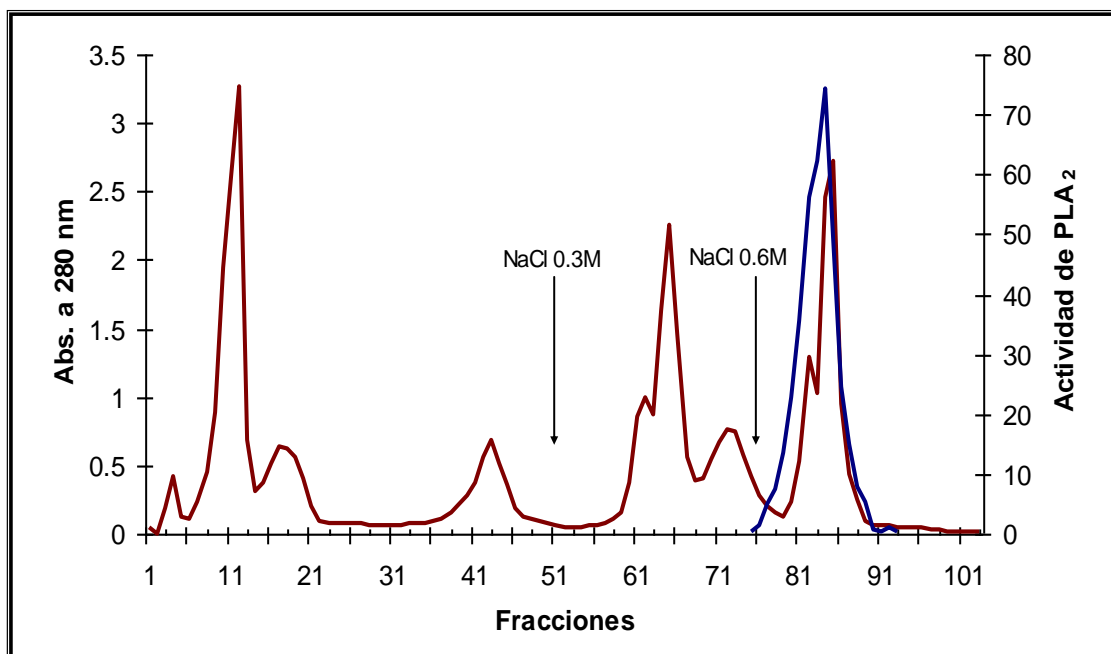


Figura 3. Primer paso de purificación de la PLA₂básica *Lmuta* por cromatografía en CM-Sephadex C-50. La actividad enzimática es mostrada en línea azul con el método de Vidal y Stoppani (1971) y en línea roja la cantidad de proteína por el método de Warburg y Christian (1941), las flechas indican los cambios de NaCl.

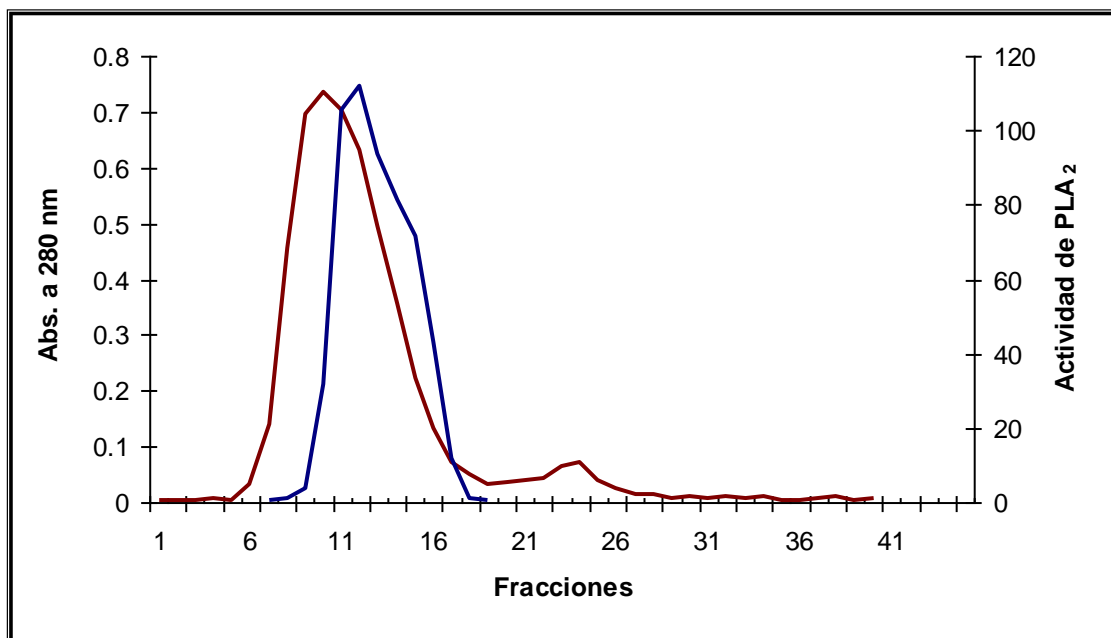


Figura 4. Segundo paso de purificación de la PLA₂básica *Lmuta* por cromatografía en Sephadex G-50. En línea roja la cantidad de proteína por el método de Warburg y Christian (1941) y en línea azul la actividad de la fosfolipasa A₂ básica con el método de Vidal y Stoppani (1971). El segundo pico de proteína indicó la presencia de contaminante.

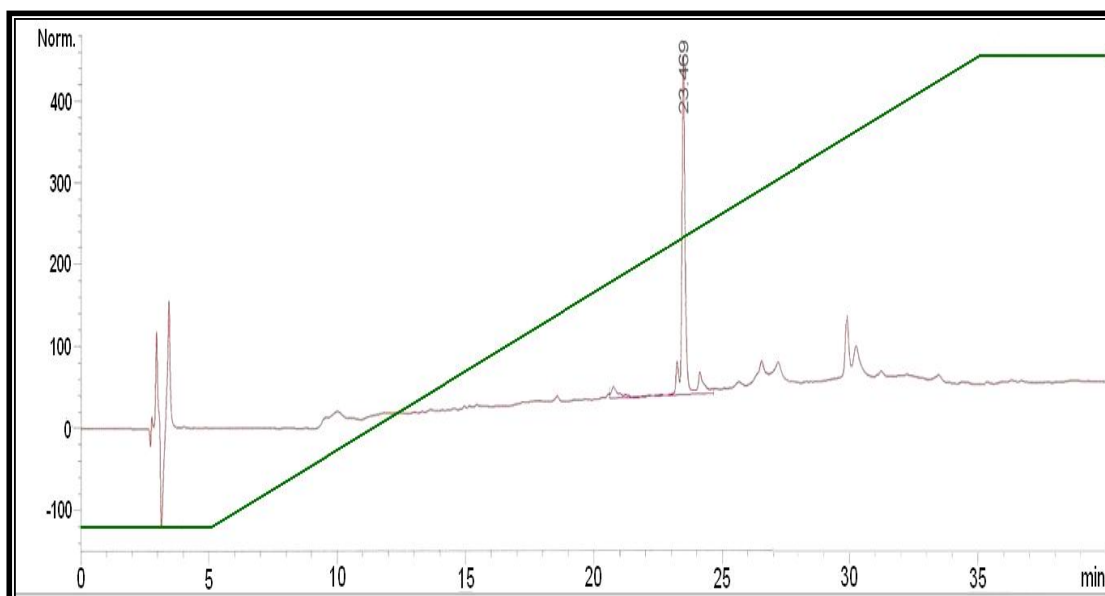


Figura 5. Tercer paso de purificación de la PLA₂básica *Lmuta* por HPLC-C18. En línea roja la cantidad de proteína por Abs. 215 nm, el mayor pico presentó actividad de fosfolipasa A₂ por el método de Vidal y Stoppani (1971). En línea verde el incremento del solvente acetonitrilo.

Tabla 1. Cuadro de Purificación de la Fosfolipasa A₂ básica de *Lachesis muta*

Pasos Cromatográficos	Cantidad de proteína		Actividad específica *	UTA	Rendimiento (%)	Purificación (Veces)
	mg.	%				
Crudo	150,3	100	3,3	495,99	100	1
CM-Sephadex C-50	22,47	14,95	60,5	1359,4	274	18,3
Sephadex G-50	2,75	1,83	92,8	255,2	51,5	28,1
HPLC C-18	2,33	1,55	135,8	316,4	63,8	41,2

UTA: Unidades Totales de Actividad

*min. de retardo/min. Incubación/mg. de proteína con el método de Vidal y Stoppani (1971).

Por otro lado, Zevallos J., en 1996 obtuvo la enzima pura a partir del veneno de *Bothrops brazili* y Carcasi R., en el mismo año la purificó del veneno de la serpiente arborícola *Bothrops biliniatus*.

En el presente trabajo se ha logrado optimizar la técnica de purificación de la fosfolipasa A₂ del veneno de *Lachesis muta* a través los tres pasos cromatográficos arriba mencionados. En otros procesos de purificación, se ha logrado obtener la enzima en un solo paso como es el caso de Soares *et al.*, (1998), quienes emplearon un intercambiador iónico para purificar una fosfolipasa con acción miotóxica denominada MTX de *B. moojeni*, Toyoma *et al.*, (1995) mediante HPLC obtuvieron la fosfolipasa de *B. pirajai*; empleando combinación de cromatografías de filtración, intercambio iónico y HPLC en condiciones normales o en fase reversa (RP-HPLC). De esta manera se pudieron purificar las fosfolipasas de *Bothrops atrox* de Colombia (Nuñez *et al.*, 2004) y *Crotalus viridis viridis* (Ownby *et al.*, 1997).

En trabajos realizados sobre veneno de *L. muta* que habitan en Brasil, se conoce la presencia de isoformas de fosfolipasa A₂, las cuales fueron purificadas empleando un primer paso cromatográfico de filtración molecular Sephacryl S-200 seguida por una cromatografía RP-HPLC identificándose 2 isoformas ácidas por el grupo de Fuly *et al.*, (2000 y 2002). En los últimos años Damico *et al* (2005a) purificó 2 isoformas básicas de la enzima empleando una resina de filtración molecular, Superdex-75, seguido por RP-HPLC para la misma especie.

A través de un modelo de inhibición empleando inhibidores plasmáticos de fosfolipasa A₂ de serpientes, se pudo revelar la presencia de cinco isoformas de PLA₂ en *L. muta*, correspondiendo a cuatro fosfolipasas ácidas y una básica (Fortes-Diaz *et al.*, 1999). Así mismo, se han purificado 6 isoformas de fosfolipasas de *Notechis sculatus*, 10 isoformas de *Pseudechis australis* y 9 isoformas en el caso de *P. australis* entre las más numerosas (Takasaki *et al.*, 1990).

En la presente investigación, la obtención de la proteína entre los dos últimos picos en presencia de gradiente salina y al ser separadas por el intercambiador catiónico CM-Sephadex C-50 a pH 5,0; indica un comportamiento básico de la enzima, a este pH la PLA₂ queda fuertemente atrapada con los grupos carboximetil del gel que se encuentra cargado negativamente, siendo necesaria una mayor concentración de NaCl para poder recuperar la enzima, lo que señalaría que el pI de esta fosfolipasa es mayor a 5 (Figura 3). Por lo tanto, se trataría de una proteína de naturaleza básica. En trabajos previos realizados por Mejia *et al.*, en el 2006 e Inga en el 2009 sobre la misma especie, se obtuvieron fosfolipasas con naturaleza ácida, siendo muy distinta a la obtenida lo que conlleva a pensar que se trataría de una isoforma. Damico *et al.*, (2005a) reportaron 2 fosfolipasas con pI muy cercanos en el rango alcalino: 8,6 y 8,7 respectivamente.

El segundo paso por cromatografía de filtración Sephadex G-50, mostró que la proteína se obtiene en el primer pico coincidiendo con la máxima actividad (figura 4), lo que sugiere que es la única proteína presente en el pico y con un peso molecular relativamente bajo, corroborando esto último usando HPLC y la técnica electroforética (figuras 5 y 6).

Por lo tanto se puede apreciar, que con el empleo de nuevas metodologías y sistemas, no sólo se logra la purificación de las proteínas sino también el descubrimiento y separación de las isoformas presentes en esta enzima, es así que se logró evidenciar esta nueva isoenzima para *Lachesis muta*.

2. Caracterización bioquímica

2.1. Evaluación de la Actividad, Pureza y Peso Molecular de Fosfolipasa A₂

La evaluación de la actividad por los métodos de retardo en la coagulación de la emulsión lipoproteica y el espectrofotométrico, dieron como resultado que este último es 2,5 veces más sensible, ya que usando 1µg de proteína el método espectrofotométrico dio 99,61 Unidades de actividad y el retardo de coagulación, 39,85 Unidades. Como la diferencia en la sensibilidad para detectar la actividad de la fosfolipasa A₂ no es significativa, se procedió a realizar los análisis enzimáticos empleando la técnica de coagulación de la yema.

El peso molecular de la enzima, se determinó bajo condiciones reductoras y no reductoras y fue calculado en 14,7 kDa (figura 6). Cabe mencionar que este valor obtenido para la enzima no es preciso, ya que se purificó a partir de veneno liofilizado, con este proceso se puede conservar las propiedades biológicas pero también podría causar un mínimo daño estructural en la enzima, siendo recomendable obtener el peso exacto a partir de la secuencia aminoacídica de la proteína madura. También se encontró una banda homogénea de proteína para ambos casos, confirmando la idoneidad del método empleado para la purificación. Así mismo la movilidad electroforética en ambas condiciones fue igual indicando que la proteína es de una estructura monomérica y de bajo peso molecular dentro de las fosfolipasas ofídicas cuyos pesos varían entre 11 y 31 kDa (Iwanaga y Suzuki, 1979).

Algunos ejemplos de PLA₂ la presenta *Bothrops asper* de 14 y 16 kDa (Gutierrez *et al.*, 1984; Kaiser *et al.*, 1990), *Bothrops alternatus* 15 kDa (Nisembum *et al.*, 1986), *Pseudechis australis* con pesos que van desde 12,97 a 13,3 kDa (Takasaki *et al.*, 1990), *Crotalus adamanteus* de 29,5-29,9 kDa (Wells y Hanahan, 1969), *Ohioophagus hanna* 13 kDa (Min-Zhou *et al.*, 1993), y los casos cercanos, las fosfolipasas A₂ de *L. muta* de Brasil reportada por Fuly *et al.*, (2002) con un peso molecular de 18 kDa y la reportada por Damico *et al.*, (2005a) de 14,25 y 14,19 kDa. Así mismo las

PLA₂ de *L. muta* de Perú obtenidas por Mejia *et al.*, (2006) de 19,05 kDa y por Inga (2009) de 18,75 kDa.

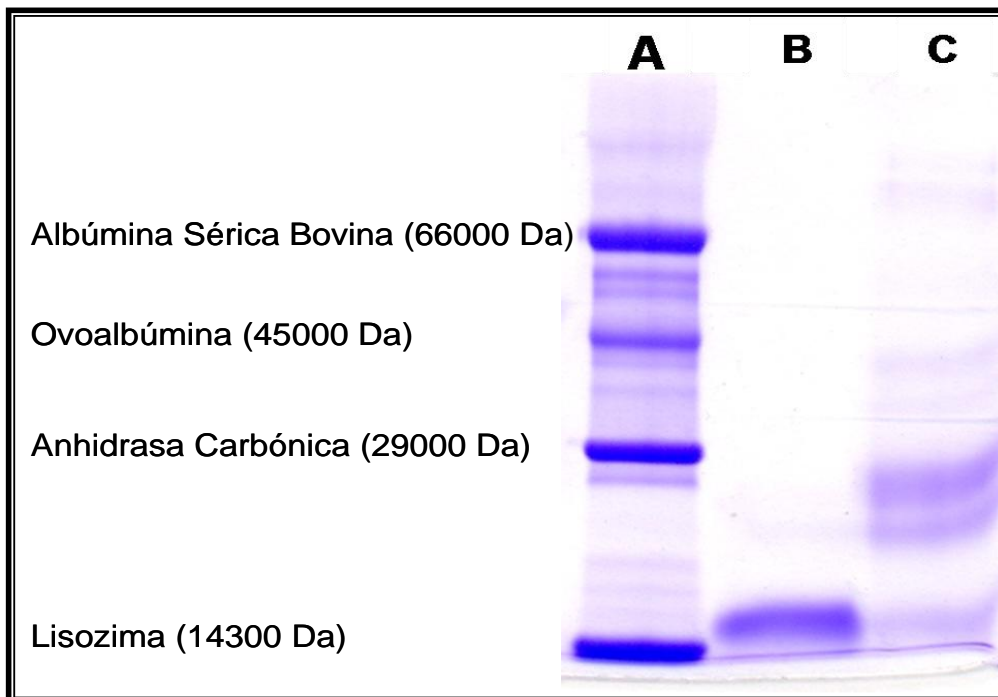


Figura 6. Determinación del peso molecular y pureza de la PLA₂básica *L.muta*. Se realizó una PAGE-SDS al 12%, se muestra los carriles en A los marcadores de peso molecular, en B la enzima purificada (se observa una sola banda de bajo peso molecular) y en C el veneno crudo de *Lachesis muta*.

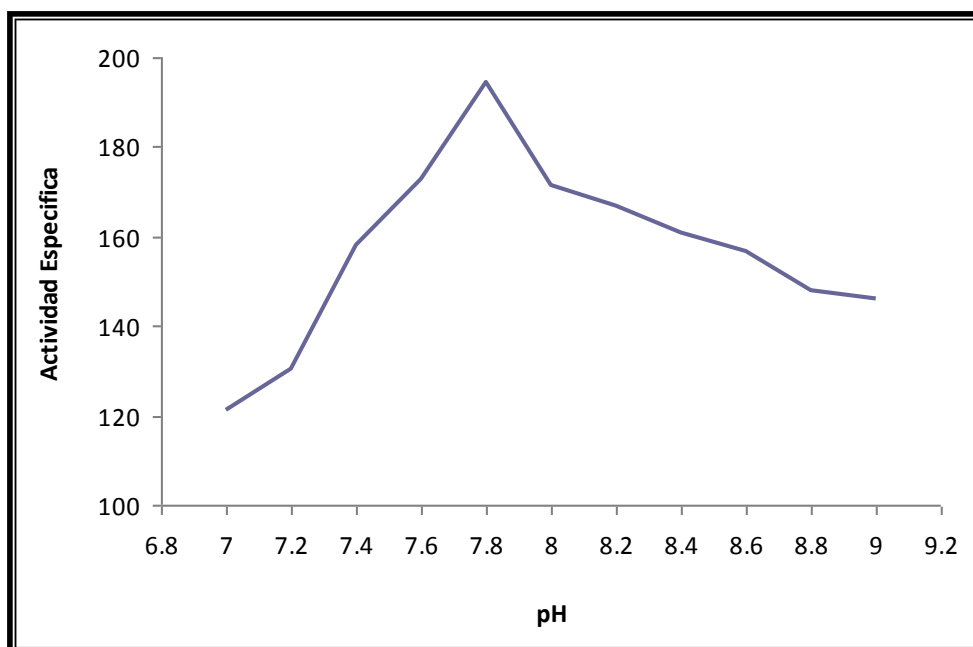


Figura 7. pH Óptimo de la fosfolipasa A₂ básica de *L. muta*. En línea azul la actividad específica de la enzima, según el procedimiento descrito en la sección 2.2.4 de la metodología.

2.2 Evaluación del pH óptimo y efecto de algunos iones, inhibidores enzimáticos y aminoácidos

La enzima posee su máxima actividad a pH de 7,8, (figura 7). La estructura y función de la mayoría de las enzimas están notablemente influenciadas por el pH, presentando funcionamiento óptimo a un pH determinado. Para las fosfolipasa A₂ su pH óptimo se presenta en un medio alcalino en el rango de 7,5 a 8,5 siendo una excepción *Micrurus spixii* que presenta un pH óptimo de 4,5.

Se propone que el ion calcio tiene la capacidad de modificar la conformación estructural tridimensional de la enzima de manera que incrementaría o disminuiría su acción enzimática. Tanto el ion calcio como magnesio favorecen la actividad de la fosfolipasa A₂ por ello se evaluó estos iones a diferentes concentraciones así como probándolos en conjunto. Se observó que el ion calcio es mejor activador que el ion magnesio ya que incrementa la actividad de la PLA₂básica *L.muta* a concentraciones menores que el magnesio (Tabla 2), al igual que en las fosfolipasas de *Bothrops neuwiddii* y *Laticauda semifasciata* (Tu *et al.*, 1970). Al evaluarse en conjunto se obtuvo una mayor actividad enzimática cuando la concentración del ion calcio es mayor al del magnesio, pero si en cambio se aumenta la concentración del ion magnesio y se mantiene estable la del calcio se observa una disminución de la actividad enzimática, sugiriendo de esta manera que el mejor activador de la enzima es el ion calcio.

De los agentes probados sólo el PMSF y el EDTA mostraron tener un efecto inhibitorio considerable (Tabla 3). El PMSF causó una pérdida de la actividad hasta un 31.7% a la concentración de 20mM mientras que, a la misma concentración, el EDTA produjo una pérdida al 35.5%.

El PMSF, fosforila los grupos hidroxilo de los aminoácidos serina y tirosina, presentes en el sitio activo y en este caso PMSF mostró ser el mayor inhibidor sobre la fosfolipasa, lo que sugeriría la presencia de estos aminoácidos como parte fundamental de la estructura catalítica, estos datos

se corroboran más adelante en el análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína.

Por otro lado el EDTA mostró un marcado efecto inhibidor de la actividad enzimática debido a que este es un agente quelante que atrapa todos los cationes divalentes presentes en el medio, dejando a la enzima sin su activador. Esto permite afirmar que la enzima requiere de calcio para potenciar su actividad.

Por otra parte el iodoacetato es un agente alquilante que reacciona con los grupos sulfhidrilos de los restos de cisteína presentes en el centro activo de ciertas enzimas, logra inhibir hasta casi el 50 % mostrando un efecto inhibitorio considerable.

Un porcentaje similar de inhibición se logró con el DTT el cual es un agente que rompe los puentes disulfuros, es de mayor potencia que el mercaptoetanol, siendo capaz de escindir los enlaces disulfuros de la enzima. Es también interesante señalar el hecho de que el mercaptoetanol, presentó una pobre inhibición de la actividad enzimática y que para el caso de esta enzima no afecta su actividad catalítica.

Así mismo, debemos resaltar el hecho que el glutatión afecta notablemente la acción enzimática, este tripéptido contiene cisteína el cual podría estar involucrado en la escisión de puentes disulfuros afectando la actividad enzimática. Un efecto similar tiene el aminoácido cisteína el cual logra inhibir a la enzima, ambos, glutatión y cisteína modificarían la estructura conformacional de la enzima, ya sea por ruptura de puentes disulfuros como es el caso del glutatión o por la formación de nuevos puentes por encontrarse cisteína libre en el medio logrando afectar su función. Sin embargo, son necesarios estudios cinéticos más profundos para determinar el modo probable de acción de los agentes mencionados.

En cuanto al efecto que producen el ácido aspártico y glutámico logran inhibir a la enzima a altas concentraciones, por lo que se sospecha que el

mecanismo de acción comprendería la atracción del calcio ligado a la enzima por tales aminoácidos ácidos, causando con ello un descenso en la afinidad PLA₂-fosfolípidos. Dicho de otra manera, los aminoácidos ácidos como aspártico y glutámico actuarían inhibiendo indirectamente a la enzima a través de la captura del calcio.

Es característico de estas enzimas el mantener su estructura por medio de enlaces disulfuros presentando en su estructura lineal entre 12-16 cisteínas tales como *Bothrops jararacussu* (Cintra *et al.*, 1993), *Bothrops moojeni* (Soares *et al.*, 1998, 2003), *Bothrops asper* (Kaiser *et al.*, 1990, Lizano *et al.*, 2001), *Lachesis muta* (Damico *et al.*, 2005a; Jiménez 2009). Esta estabilidad estaría atribuida a la adaptación de la estructura proteica para que la enzima permanezca activa a los cambios de temperatura bruscos especialmente en aquellas serpientes que habitan zonas tropicales como es el caso de *L. muta* que vive en la selva amazónica o el de la cobra *Ophiophagus hannah* (Minh-Zhou *et al.*, 1993) que habita en la zona desértica de la india con temperaturas mayores a 50°C en el día.

Tabla 2. Efecto de algunos iones sobre la actividad de PLA₂

ION	Actividad Específica (%)			
	0,1mM	0,5mM	1mM	5mM
Control sin Ion	100 %			
Calcio	88,4	132,5	158,4	161,2
Magnesio	80,9	86,3	105,5	118,1
Ca ²⁺ 1mM + Mg ²⁺ 5mM	81,4			
Ca ²⁺ 1mM + Mg ²⁺ 1mM	86,5			
Ca ²⁺ 1mM + Mg ²⁺ 0,5mM	108,4			
Ca ²⁺ 1mM + Mg ²⁺ 0,1mM	135,8			
Mg ²⁺ 1mM + Ca ²⁺ 5mM	133,6			
Mg ²⁺ 1mM + Ca ²⁺ 0,5mM	94,9			
Mg ²⁺ 1mM + Ca ²⁺ 0,1mM	87,9			

mM = milimolar

Ca²⁺ = calcio

Mg²⁺ = magnesio

Tabla 3. Efecto de algunos inhibidores sobre la actividad de PLA₂

AGENTE	2.5mM	5mM	10mM	20mM
Control	100% de Actividad			
2-Mercaptoetanol	100	100	99,2	93,4
DTT	96	86,1	83,5	51,8
Iodoacetato	88,5	73,2	67,3	58,6
EDTA	84	73,4	50,5	35,5
PMSF	61,9	46,7	42,4	31,7
Acido aspártico	92,7	85,5	82,1	65,9
Acido glutámico	92,6	81,6	66,6	59,5
Cisteina	85,5	83,7	59,7	55,9
Glutation	81,7	70	54,1	49,8

mM = milimolar

DTT = ditiotreitól

EDTA = Etilen diamino tetra acético.

PMSF = Fenil metil sulfonil fluoruro

3. Caracterización biológica

3.1 Actividad Hemolítica

De acuerdo con las pruebas, la enzima no muestra actividad hemolítica directa, pero si se observó actividad hemolítica indirecta tanto con la prueba en tubo (figura 8) como en placa (figura 9); determinándose una Dosis Hemolítica media (DH_{50}) de 5.5µg/tubo para la PLA_2 y de 69.2µg/tubo para el veneno crudo, siendo 12.6 veces más hemolítico la proteína pura. Estos valores son muy cercanos a los reportados por Inga (2009). Así mismo Castañón *et al.*, (1993) encontró un DH_{50} de 48.7 µg usando veneno cristalizado de *L. muta* procedente de Amazonas. Esta variación podría deberse a tres factores: primero, al lugar de procedencia de las serpientes, ya que su habitat y alimentación están directamente relacionados con las modificaciones en la expresión de sus proteínas. En segundo lugar, al tipo de muestra, veneno cristalizado o liofilizado, estos procesos de preservación modifican el componente proteico de los venenos. Tercero, la característica innata de esta enzima, al presentar isoformas, cada una de ellas con diferente acción y potencia biológica. (Cárdenas, 1993; Chippaux, 1991).

Aunque todavía no se conoce el mecanismo exacto de la hemólisis se discuten varias opciones una de ellas indicaría que la enzima requiere de la presencia de fosfolípidos libres o lipoproteínas, la acción se debe a que la enzima hidroliza previamente los fosfolípidos libres, liberando lisolectina la que a su vez por acción detergente es capaz de inducir hemólisis. Sólo pocas fosfolipasas, como la de *Echis carinatus*, muestran actividad hemolítica directa (Kemparaju *et al.*, 1994). Otro caso es el de *Agkistrodom halys blomhoffii* que puede hidrolizar los fosfolípidos de la membrana de eritrocitos causando su hemólisis aún sin la presencia de un componente denominado factor lítico directo, FLD (Martin *et al.*, 1975). En otras fosfolipasas como las de *Crotalus durissus terrificus* y *Crotalus adamanteus* requieren desoxicolato, el cual al parecer podría remplazar al FLD (Hendon y Fraenkel-Conrat, 1971).

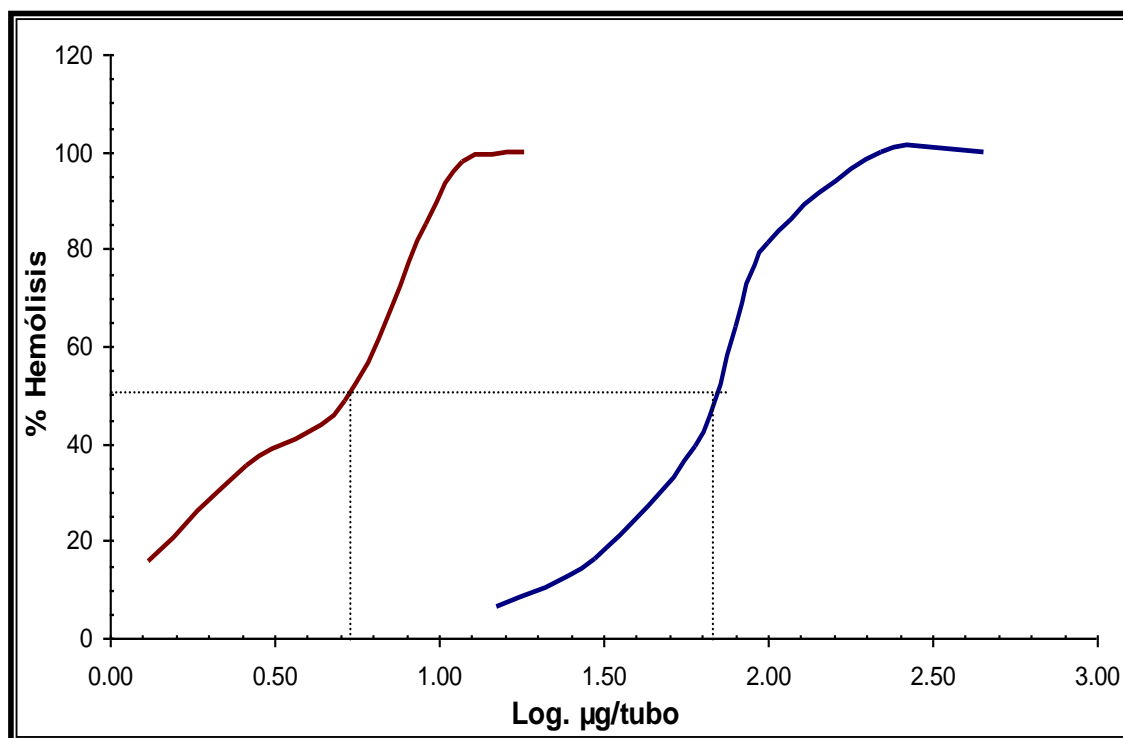


Figura 8. Determinación de la dosis hemolítica media DH_{50} . En línea azul actividad hemolítica indirecta en tubo del veneno total de la serpiente *L. muta*, en línea roja la actividad hemolítica indirecta en tubo de la PLA_2 básica *L. muta* por el método de Condrea *et al* (1964). A menor valor Log. $\mu\text{g/tubo}$ mayor potencia hemolítica.

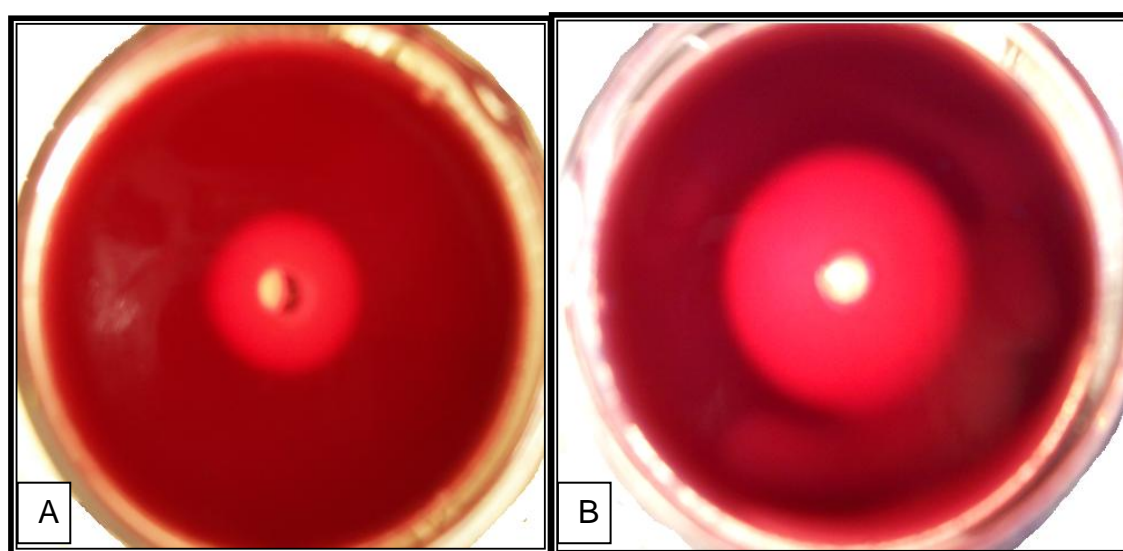


Figura 9. Actividad hemolítica indirecta en placa de la PLA_2 básica *L. muta*. Se empleó la DH_{50} de la fosfolipasa, en A) halo hemolítico a las 12 horas y en B) halo hemolítico a las 24 horas de 2,4 cm. Estos valores son considerados y empleados cuando se examinó el potencial neutralizante del suero antilachésico.

Se piensa que la función principal del FLD y otros componentes básicos es desorganizar la matriz de la membrana de los eritrocitos de manera que la fosfolipasa A del veneno pueda atacar la fosfatidilcolina con mayor eficacia. A pesar que la membrana celular resiste la acción hidrolítica de las PLA₂ secretoras, esta membrana llega a ser susceptible durante la apoptosis u otros traumas celulares. Experimentalmente, la susceptibilidad a la enzima puede ser inducida agregando calcio a las células. En los eritrocitos humanos, la habilidad de los ionoforos de calcio para causar susceptibilidad depende de la temperatura, optimizándose por encima de los 35°C. (Jensen *et al.*, 2005)

3.2 Actividad Edemática

La fosfolipasa A₂ en estudio produjo edema en la almohadilla plantar posterior de los ratones, para determinar la potencia de este efecto se determinó la Dosis Edemática Mínima (DEM) la cual se expresa en µg de proteína, cuanto más bajo es el valor DEM más potente es la enzima, siendo la DEM para esta enzima de 23,56 µg. (Fig.10). En contraste con los valores encontrados para las serpientes de América central, *Lachesis muta stenophrys*, *Crotalus durissus durissus* y *B. asper* en 5µg, 11µg y 38µg respectivamente (Lomonte, 1985; Lomonte y Gutierrez, 1989) y 91,5µg para la PLA₂ ácida de *Lachesis muta* de Perú (Inga, 2009). La PLA₂básica *L.muta* presenta un moderado efecto edemático, esta observación sugiere que el efecto edematizante del veneno crudo de *L. muta* no depende única y directamente de esta enzima.

La vía como estas fosfolipasas se encuentran involucradas en la formación de edemas es todavía discutido, la formación de edema se define como el incremento en la permeabilidad microvascular que conduce a una extravasación de fluídos y su acumulación en los espacios intersticiales de los tejidos, el veneno causa la exocitosis y degranulación de mastocitos del mesenterio con la liberación de gránulos, liberando histaminas los cuales pueden ser responsables del edema, esta liberación de histaminas es

estimulada por las fosfolipasas y la acción ha sido correlacionada con su capacidad para hidrolizar fosfolípidos (Chem *et al.*, 1984). Por otro lado la excesiva estimulación de la cascada de liberación de ácido araquidónico de fosfolípidos de membrana por una PLA₂, permite la formación de concentraciones fisiopatológicas de mediadores lipídicos como prostaglandinas, leucotrienos, lisofosfolípidos y factores de activación plaquetaria los cuales están implicados en el desarrollo de la inflamación (Lehr, 2001). La manipulación de las fosfolipasas A₂ con actividad edemática, ofrecen un nuevo enfoque para el desarrollo de agentes antiinflamatorios. (Marshall *et al.*, 1989).

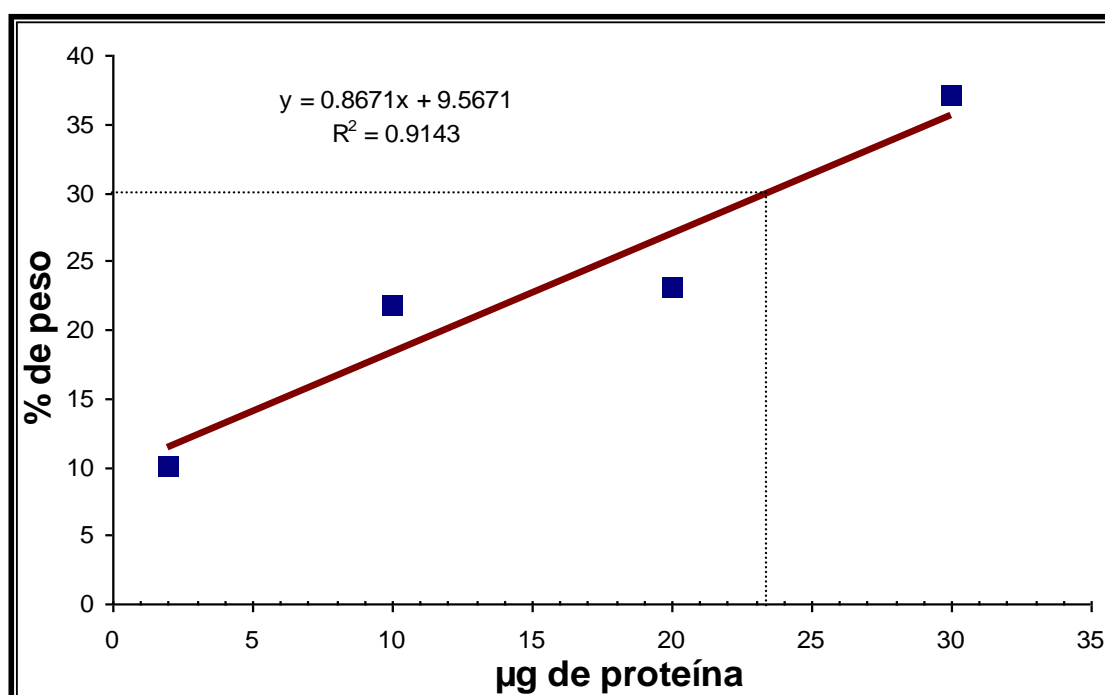


Figura 10. Actividad edemática de la fosfolipasa A₂ básica de *Lachesis muta*. En cuadrados azules la actividad edemática de la PLA₂básica *L.muta*, evaluado por el método de Yamakawa *et al.*, (1976) para determinar la Dosis edemática media DEM, µg de enzima capaz de producir una diferencia de peso equivalente al 30% por regresión lineal en línea roja.

3.3 Actividad Hemorrágica y Anticoagulante

La fosfolipasa A_2 de *Lachesis muta* no mostró tener actividad hemorrágica a las concentraciones de 2, 5, 10 y 20 μg , al inocularse en piel de ratones albinos. Mientras que en el veneno crudo este efecto es potente, lo que indicaría que sería otra enzima la encargada de esta reacción.

Así mismo esta enzima es incapaz de retardar el tiempo de coagulación del plasma humano, por lo que PLA_2 básica *L.muta* no estaría involucrada en la cascada de coagulación.

3.4 Actividad Miotóxica

Se determinó la Dosis Miotóxica Mínima (DMM) de la PLA_2 básica *L.muta* en un valor de 18,96 $\mu\text{g/ml}$ (Fig.11) y la del veneno crudo en 103,12 $\mu\text{g/ml}$, resultando ser la enzima purificada 5,4 veces más potente. A diferencia de la PLA_2 ácida de *L. muta* con un DMM de 125.89 $\mu\text{g/ml}$ (Inga, 2009). En el caso de la fosfolipasa A_2 LmTx-I básica de *Lachesis muta muta* presenta *in vivo* una baja actividad miotóxica pero un potente efecto neuromuscular pre sináptico (Damico *et al.*, 2005b).

La primera miotoxina purificada del veneno de la serpiente *Bothrops brazili*, fue empleando un solo paso cromatográfico de intercambio iónico. La proteína es de naturaleza básica, con un peso molecular de 30 KDa, y está formada por 2 cadenas polipeptídicas de 15 KDa cada una. La inoculación de la miotoxina en el músculo gastrocnemius de ratones albinos, produce una severa necrosis del tejido. La miotoxina no tiene actividad hemolítica ni anticoagulante; sin embargo, sí produce edema, con un DEM de 32,6 mg de proteína (Pantigoso *et al*, 2001).

Tanto la PLA_2 básica *L.muta* como LmTx-I son fosfolipasas básicas que presentan Asp en el residuo 49. Se ha encontrado que la mayoría de las miotoxinas aisladas del veneno de la familia Viperidae son proteínas básicas; *Trimeresurus flavoviridis* (Liu *et al.*, 1990) *Bothrops jararacussu*

(Chiota, 2002), *Bothrops atrox* (Núñez *et al.*, 2004), *Lachesis muta muta* (Damico *et al.*, 2005b), etc. Muchas de estas PLA₂ básicas contienen una sustitución crítica en el sitio de unión al calcio en Asp49 – Lys49, algunos estudios evolutivos sugieren que las fosfolipasas Lys49 surgieron de la duplicación de un gen ancestral (Ohno *et al.*, 2003), disminuyendo o inactivando la actividad catalítica de la enzima, sin comprometer su efecto biológico (Ownby *et al.*, 1999; Núñez *et al.*, 2004). En las Asp49-PLA₂s, los oxígenos del grupo carboxilo del Asp49 contribuyen a la coordinación catalítica con el Ca²⁺ y la sustitución por Lys en esta posición resulta en la pérdida de unión al Ca²⁺ resultando en una débil actividad hidrolítica contra fosfolípidos naturales o sintéticos, demostrando que el daño a las membranas por las Lys49PLA₂ miotóxicas es independiente de calcio (de Oliveira *et al.*, 2001), estas toxinas afectan preferentemente a las bicapas cargadas negativamente con temperaturas por encima de la fase de transición, sugiriendo que la interacción electrostática entre residuos catiónicos en la PLA₂ y los residuos cargados negativamente en la membrana, son requeridos para desestabilizar la membrana (Gutierrez y Ownby, 2003).

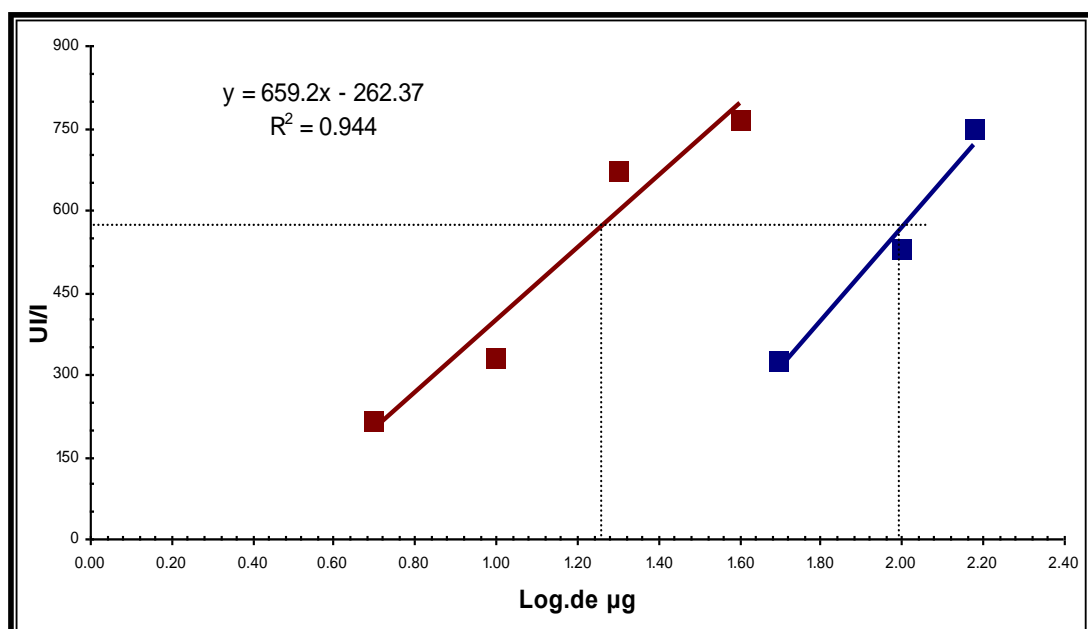


Figura 11. Actividad miotóxica de PLA₂básica *L.muta*. En cuadrados azules la actividad miotóxica del veneno total y en cuadrados rojos la actividad miotóxica de la PLA₂básica *L.muta*, evaluado por el método de Gutiérrez *et al.*, (1980). Se determinó la DMM por regresión lineal considerando los µg de enzima capaz de producir 4 veces la actividad de CK en UI/L (unidades internacionales por litro) del control negativo

Por estudios de mutagénesis dirigida se encontró que tanto en las Asp49 y Lys49 PLA₂ miotóxicas, existen regiones catiónicas e hidrofóbicas que están involucradas con la actividad miotóxica, estos sitios catiónicos están localizados hacia el extremo amino terminal de la hélice hidrofóbica, el efecto de esta modificación es probablemente debido a la remoción de una región de interacción del N-terminal con la membrana de su célula blanco (Soares y Giglio, 2003).

4. Pruebas inmunológicas

Las pruebas de inmunodifusión (figura 12A, B) e inmunolectroforesis (figura 12C) demostraron que la fosfolipasa A₂ es reconocida por el suero antilachésico monovalente, así mismo el antiveneno logra neutralizar de manera parcial la actividad enzimática hasta en un 68,4% empleando 2 dosis de neutralización (figura 13).

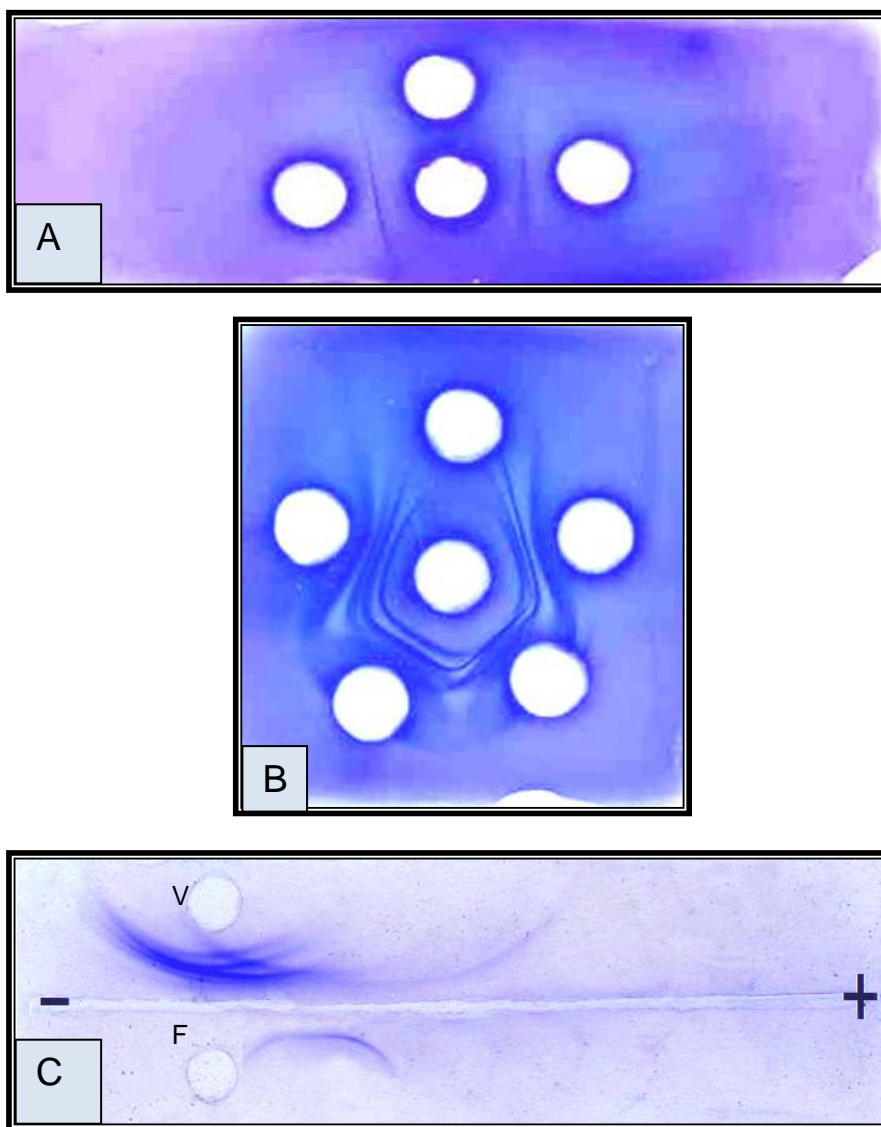


Figura 12. Antigenicidad de la PLA₂básica *L.muta*. En A) Inmunodifusión de la enzima pura, en B) Inmunodifusion radial del veneno total a diferentes concentraciones, en el pocillo central suero antilachésico y en C) Inmunolectroforesis del veneno total (V) y de la PLA₂básica *L.muta* (F). La presencia de halo de precipitación indica el reconocimiento por el suero antilachésico. Según lo descrito en la metodología (sección 2.4.1).

En cuanto a las actividades biológicas, el suero logra inhibir en un 54,2 % la actividad hemolítica (prueba en placa) (figura 14), en un 37,9% la actividad edemática (figura 15) y en un 39,2% la actividad miotóxica (figura 16), empleando en los tres casos, las mayores dosis del suero antiofídico.

La obtención de reactividad inmunológica, indica claramente que la PLA₂básica*L.muta*, a pesar de encontrarse entre las proteínas más pequeñas del veneno puede inducir anticuerpos neutralizantes, lo que resulta muy importante para neutralizar esta proteína y sus consecuentes acciones con la aplicación del antiveneno monovalente. También es interesante señalar que el antiveneno reduce la actividad enzimática de la proteína purificada, luego de preincubar mezclas de veneno-antiveneno.

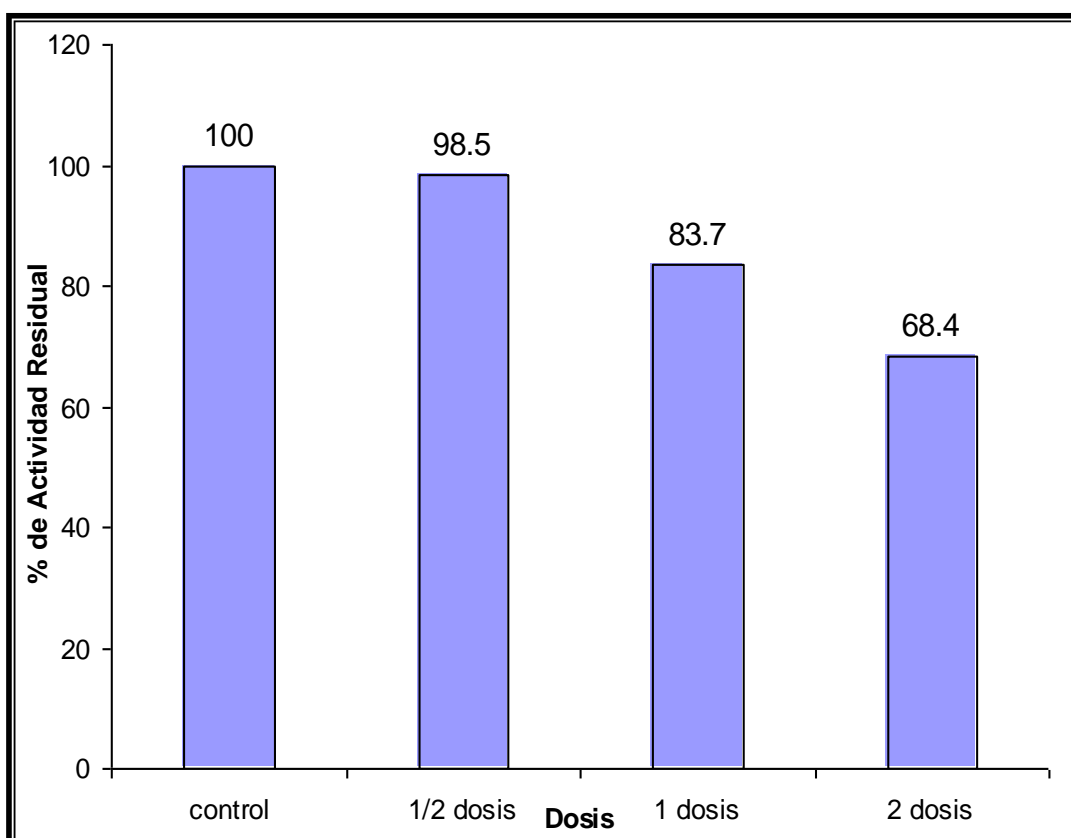


Figura 13. Neutralización de la actividad enzimática de PLA₂básica*L.muta*. Los valores sobre las barras celestes indican el porcentaje de actividad enzimática con el método de Vidal y Stoppani (1971) después de la incubación de la enzima con el suero antilachésico como se describe en la metodología (sección 2.4.3).

La capacidad neutralizante de los sueros han sido investigadas mediante dos tipos de experimentos: (a) Aquellos en los que el suero se incubaba con el veneno previo a su inoculación en animales de experimentación; y (b) aquellos en los que el suero se administra por la vía intravenosa a diferentes intervalos de tiempo después de la inoculación del veneno. Diferentes estudios han encontrado una mejor neutralización cuando el suero y el veneno son incubados previo a su inoculación (Gutiérrez *et al.*, 1988b).

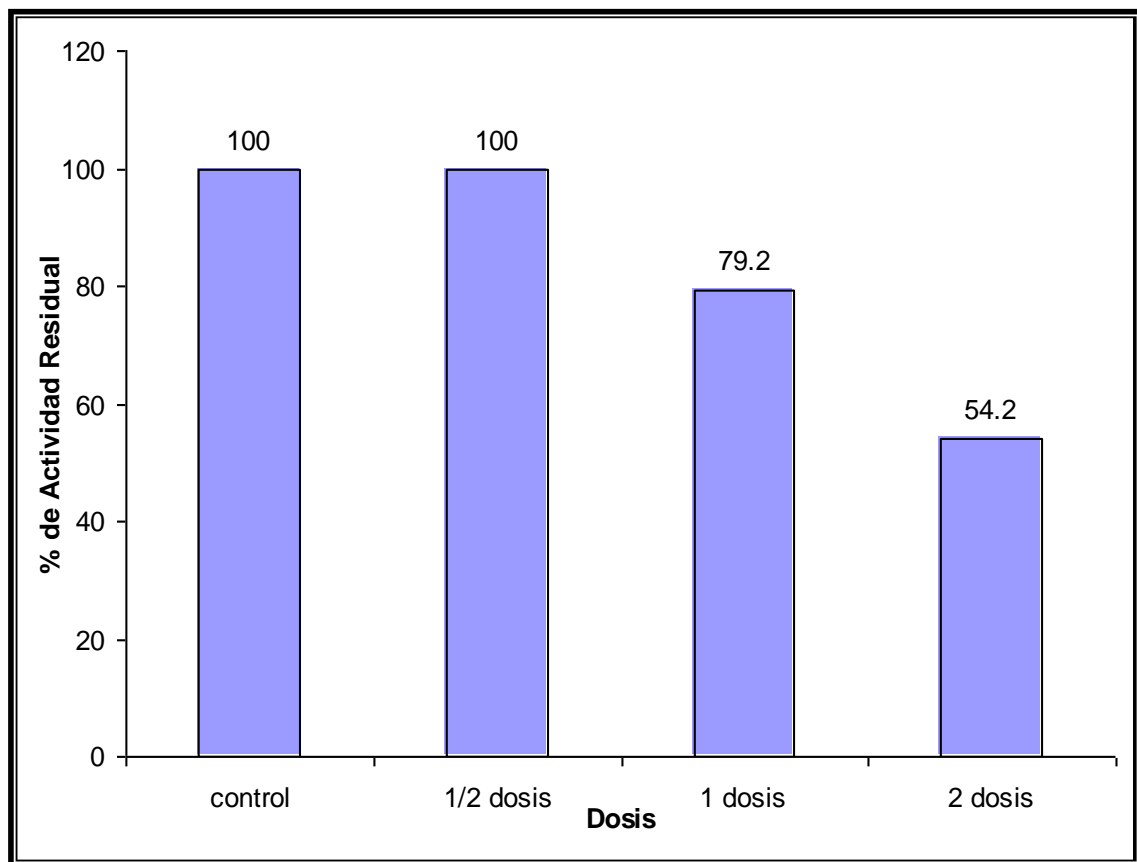


Figura 14. Neutralización de la actividad hemolítica de PLA₂básica *L.muta*. Los valores sobre las barras celestes indican el porcentaje de actividad hemolítica en placa con el método de Haberman y Hard (1972) modificado por Gutiérrez *et al.*, (1988a), considerando la DHM como el 100 % de actividad, después de las 24 horas como se describe en la metodología (sección 2.4.4).

Experimentos con suero anticrotálico muestran la cercana relación entre la actividad antifosfolipásica y la potencia neutralizante, considerando que en el caso de *C. durissus terrificus*, la crotoxina (fosfolipasa A₂ y la crotapotina) representa el 68% del veneno crudo, por lo que al neutralizar al mayor componente del veneno, la crotoxina, se estaría neutralizando la letalidad del veneno (Da Silva y Goulherme, 1982).

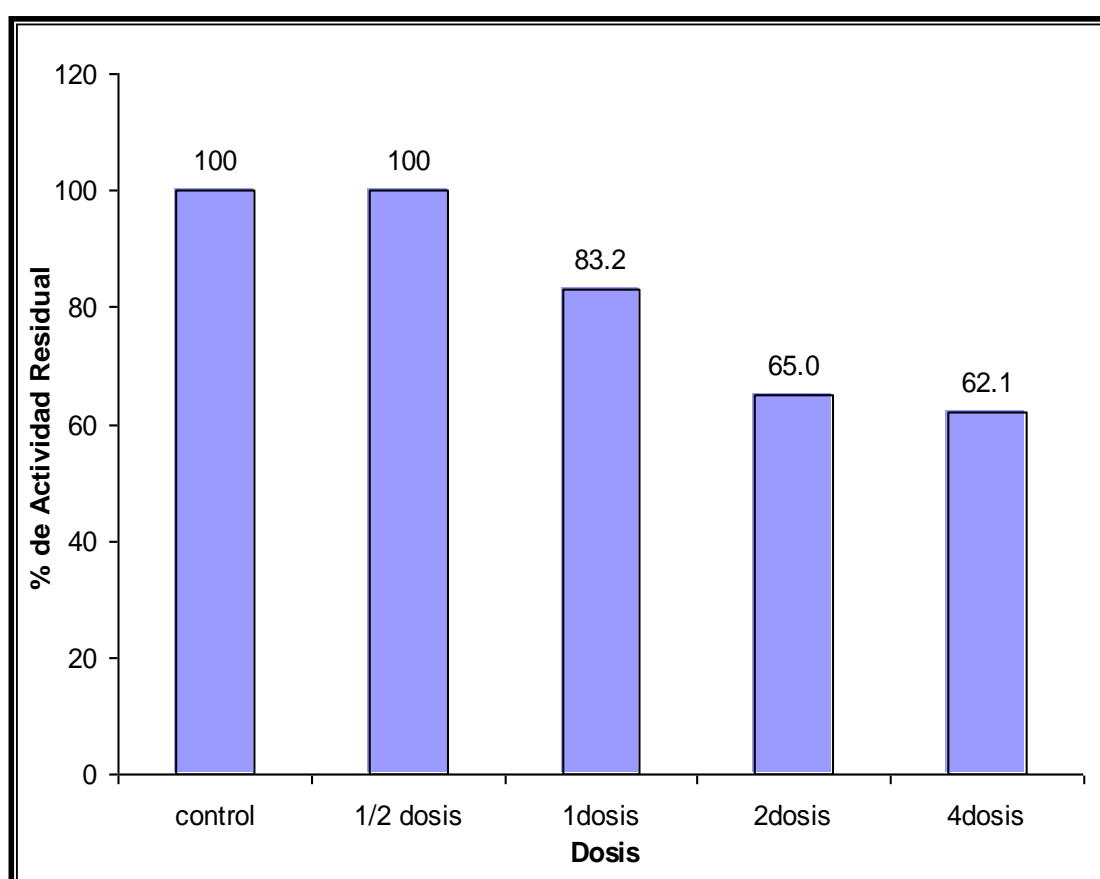


Figura 15. Neutralización de la actividad edemática de PLA₂básica *L.muta*. Los valores sobre las barras celestes indican el porcentaje de actividad edemática con el método de Yamakawa *et al.*, (1976) considerando la DEM como el 100 % de actividad, después de la incubación de la enzima con el suero antilachésico como se describe en la metodología (sección 2.4.5).

Habermann y Hardt (1972) desarrollaron una técnica para cuantificar la actividad de fosfolipasa A₂, basada en la formación de halos hemolíticos en geles de agar conteniendo eritrocitos y fosfolípidos de yema de huevo; Gutierrez *et al.*, en 1988b emplearon esta técnica para probar la potencia de antivenenos polivalentes sobre el veneno de *B. asper*, encontrando una correlación con alta significancia entre esta prueba y la basada en la neutralización de la letalidad, sugiriendo que esta prueba, muy simple y sensible, puede ser empleada para la medición de la neutralización.

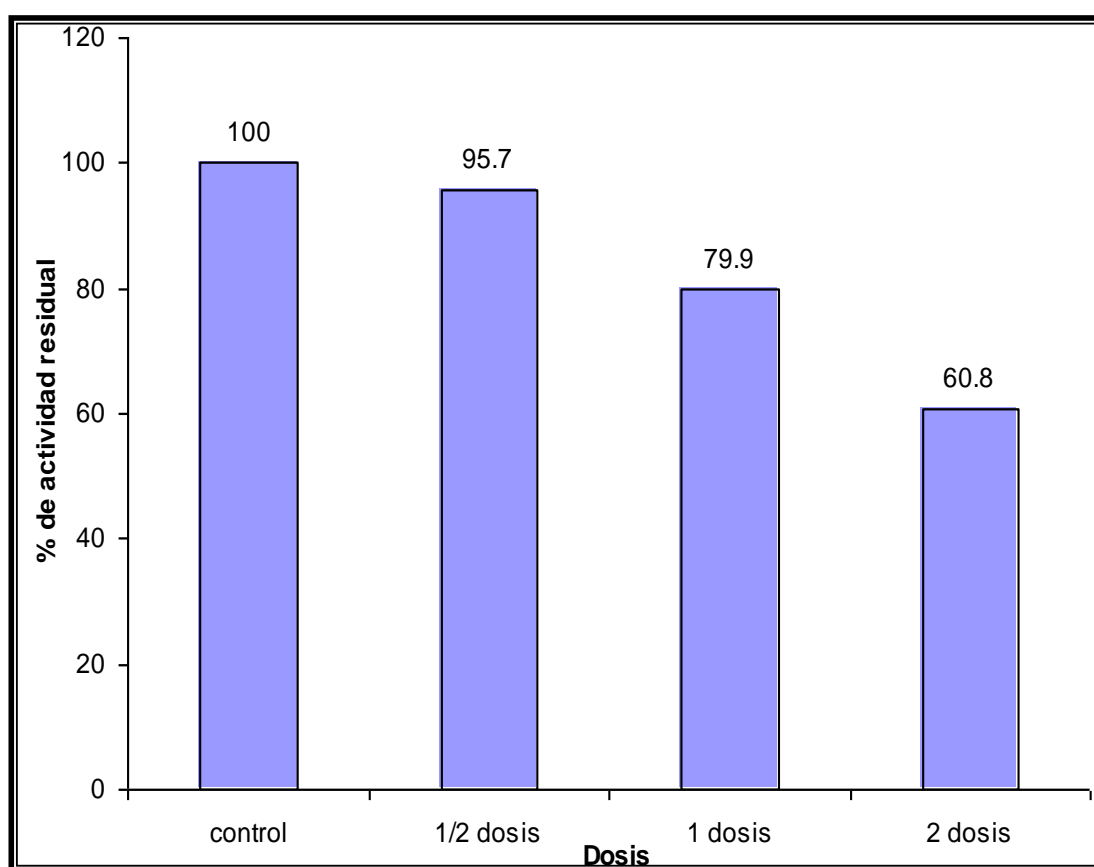


Figura 16. Neutralización de la actividad miotóxica de PLA₂básica *L.muta*. Los valores sobre las barras celestes indican el porcentaje de actividad miotóxica estandarizada por Gutiérrez *et al.*, (1980) considerando la DMM como el 100 % de actividad, después de la incubación de la enzima con el suero antilachésico como se describe en la metodología (sección 2.4.6).

Como se observa la neutralización de los efectos biológicos por el suero antilachésico no es total, esto se debería, a que los anticuerpos pueden estar reconociendo el sitio enzimático mas no los sitios farmacológicos, quedando libres y actuando rápidamente sobre su células blanco.

También debemos de señalar que en el caso de las miotoxinas, actúan directamente sobre la membrana plasmática de los miocitos. En el caso de *Bothrops asper* y *Bothrops nummifer*, se ha aislado varias miotoxinas, las cuales inducen un cuadro similar cuando se preincuban con este veneno antes de inocularse. Sin embargo, cuando se efectúan experimentos con inoculación independiente de veneno y suero, la neutralización de la miotoxicidad es sólo parcial (Gutiérrez *et al.*, 1988b) Esto indica que la acción de la fosfolipasas es rápida y drástica dificultando el éxito del tratamiento. Por otro lado, el efecto edematizante es inducido a pocos minutos después de la inoculación del veneno, esto debido a que afecta la integridad de los vasos originando un aumento en la permeabilidad Gutiérrez *et al.*, (1986). Se ha propuesto que los venenos cuya actividad edemática es mal neutralizada, podrían contener toxinas de bajo peso molecular, incapaces de inducir formación de anticuerpos cuando los venenos son inoculados en caballos (Rojas *et al.*, 1987).

La neutralización de los efectos locales como hemorragia, mionecrosis y edema inducidos por las enzimas es baja, debido a su rápido efecto una vez inoculado el veneno lo que ocurre en condiciones naturales, posiblemente cuando los anticuerpos neutralizantes llegan al tejido afectado, ya se ha producido buena parte de la destrucción tisular y de las alteraciones vasculares dificultando el acceso de los anticuerpos a los sitios afectados. Esto indica que la rapidez con la que se inicie la seroterapia es un factor fundamental en la neutralización de los efectos locales y en la disminución de las posibles secuelas de estos efectos.

5. Caracterización Molecular

5.1 Síntesis de cDNA y Amplificación del gen de la PLA₂

Se obtuvo mRNA a partir del veneno fresco, obtenido por presión manual, sintetizándose a partir de ello el DNA complementario (cDNA) de la fosfolipasa A₂ empleando RT-PCR, así por cada 7 µl de mRNA total, se obtuvieron 20 µl de cDNA, los cuales fueron utilizados para amplificar el gen de la PLA₂, se emplearon los 2 pares de primers sintetizados, los cuales se alinean con los extremos del gen donde hay regiones muy conservadas. Los primers que presentaron mejores resultados fueron:

F1PLA₂ 5'-TGGCCGTGTTGCTGSTGGGCGTCG-3',

R1PLA₂ 5'-AGGGGTTTTTCCCRGCCTGCAG-3'.

El cDNA amplificado presentó un fragmento de 450 nucleótidos aproximadamente (figura 17).

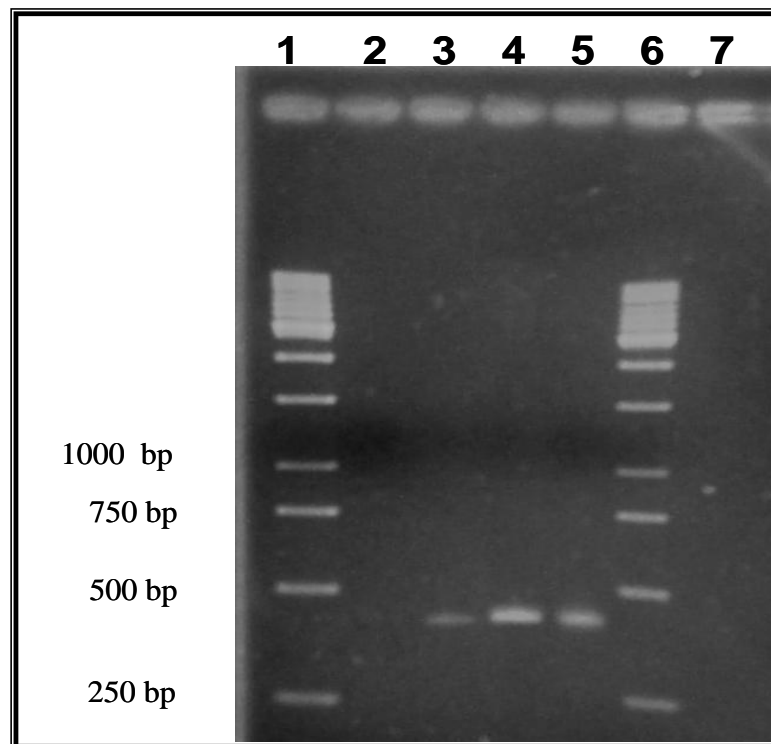


Figura 17. Amplificado de cDNA de la PLA₂básica *L.muta*. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, en los carriles 1 y 6 marcador 1kb DNA, 2 y 7 control negativo, 3, 4 y 5 producto de amplificado por PCR a partir de 1ng, 80ng y 40ng de cDNA respectivamente.

Al igual que los componentes proteicos que participan en el envenenamiento, las PLA2 son codificadas en las glándulas del veneno por este motivo, los estudios sobre transcriptoma del veneno conllevan al sacrificio de especímenes para la obtención de dichas glándulas. Sin embargo, Jiménez (2009) demostró que es posible la obtención de RNAs a partir de la extracción del veneno fresco, sin la necesidad de sacrificar al espécimen, es importante recalcar este punto ya que debido a la tala indiscriminada, así como a la usurpación de los territorios amazónicos donde habitan estas especies, muchas de ellas están en proceso de extinción tanto por la pérdida de su hábitat, como por la matanza de las serpientes por parte de los trabajadores que temen ser mordidos; con este descubrimiento ha sido posible la obtención del mRNA de la serpiente *Lachesis muta* y continuar con otros estudios con el veneno sin necesidad de sacrificar al espécimen.

5.2 Secuenciación y Análisis Bioinformático.

Alineamiento de la secuencia nucleotídica

El producto amplificado se secuenció por ambos extremos obteniendo 445 pares de bases. El análisis bioinformático de la secuencia nucleotídica obtenida, se realizó mediante la comparación de dicha secuencia con aquellas depositadas en el Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante el algoritmo BLASTn del NCBI, obteniendo un 95% de identidad con la isoforma de fosfolipasa A₂ de *Lachesis muta* (Jiménez, 2009) y con un promedio de 87% de identidad con otras fosfolipasas provenientes de serpientes de la familia Viperidae (tabla 4) confirmando que la secuencia obtenida en el presente trabajo pertenece a una fosfolipasa A₂. Esta enzima es una isoforma de la Lm-PLA₂-Perú (Jiménez, 2009) y ambas son las primeras isoformas encontradas para serpientes peruanas.

Tabla 4. Alineamiento de la secuencia nucleotídica la PLA₂ de *Lachesis muta* (PLA₂básica*L.muta*)

N° de acceso	Descripción	Max score	Total score	E value	Max ident
GQ265920.1	<i>Lachesis muta</i> phospholipase A2 (PLA2) mRNA acidic	710	710	0.0	95%
D31774.1	<i>Trimeresurus gramineus</i> cTgPLA2-I mRNA acidic	544	544	2e-151	89%
AY211939.1	<i>Trimeresurus stejnegeri</i> phospholipase A2 acidic	538	538	1e-149	88%
AY764141.1	<i>Trimeresurus gracilis</i> acidic phospholipase A2 mRNA basic	496	496	6e-137	87%
AY434727.1	<i>Gloydus shedaoensis</i> acidic phospholipase A2 mRNA basic	459	459	8e-126	90%
AF015247.1	<i>Gloydus halys</i> isolate A'-PLA2 phospholipase A2 mRNA acidic	459	459	8e-126	89%
D49388.1	<i>Trimeresurus</i> <i>okinavensis</i> mRNA basic	429	429	7e-117	84%
AY120875.1	<i>Crotalus viridis viridis</i> strain E6e acidic phospholipase A2 mRNA,	427	427	2e-116	84%
AY145836.1	<i>Bothrops jararacussu</i> hypotensive phospholipase A2 mRNA basic.	422	422	1e-114	85%

Estas secuencias fueron alineadas y editadas empleando el programa ClustalX y BoxShade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) respectivamente. Observándose que las regiones no traducidas (UTR) 5' y 3' son altamente conservadas (Figura 18).

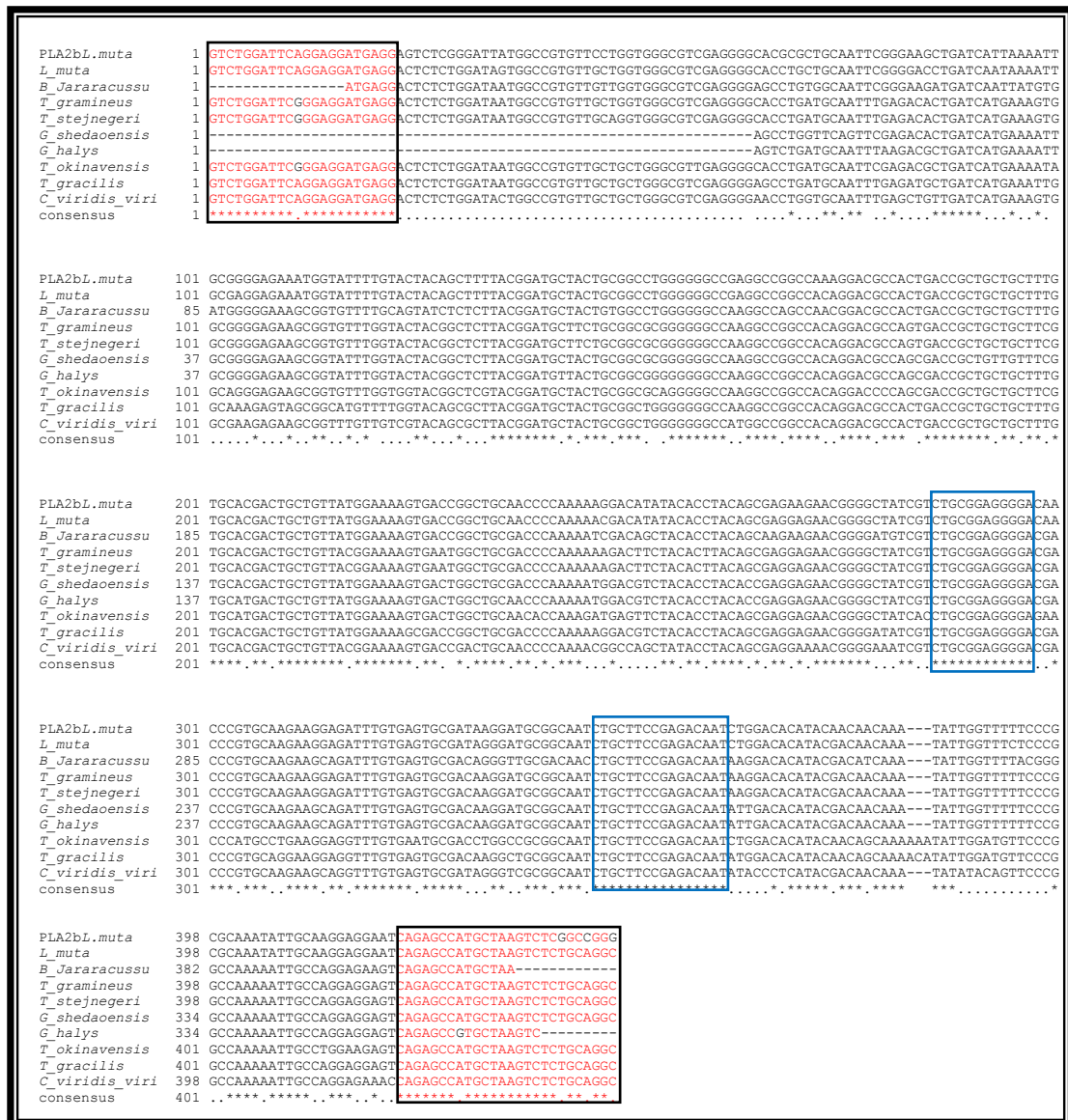


Figura 18. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de la PLA₂. Se editaron con el programa Boxshade, coloreándose de rojo y enmarcado las regiones conservadas de los extremos no traducidos (UTR) 5' y 3', y en marcos azules regiones de mayor consenso.

Hasta el 2003 se tenían 81cDNAs y 20 genes que codifican las PLA₂s del grupo II (Viperidae) y 67 cDNAs con 26 genes para las PLA₂s del grupo I (Elapidae) (Ohno *et al.*, 2003). El número sigue en aumento debido a la gran importancia y usos biotecnológicos que ha adquirido dicha enzima.

Análisis de la Estructura Primaria de la Fosfolipasa

Para el estudio de la estructura primaria de la PLA₂ amplificada, primero se realizó un análisis para reafirmar que la secuencia nucleotídica sea codificante, para ello empleamos el programa *ORF Finder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) el cual nos permite encontrar todos los posibles marcos de lectura abierta (ORF), así como la longitud de la proteína. El ORF propuesto se muestra en la Fig. 19 y 20. Se observa que en los codones a nivel de la primera y segunda posición nucleotídica, se presenta un mayor número de substituciones, esta variabilidad podría explicar el gran número de isoenzimas de PLA₂ con actividades biológicas diversas, que es característico de las PLA₂s provenientes de venenos de serpientes.

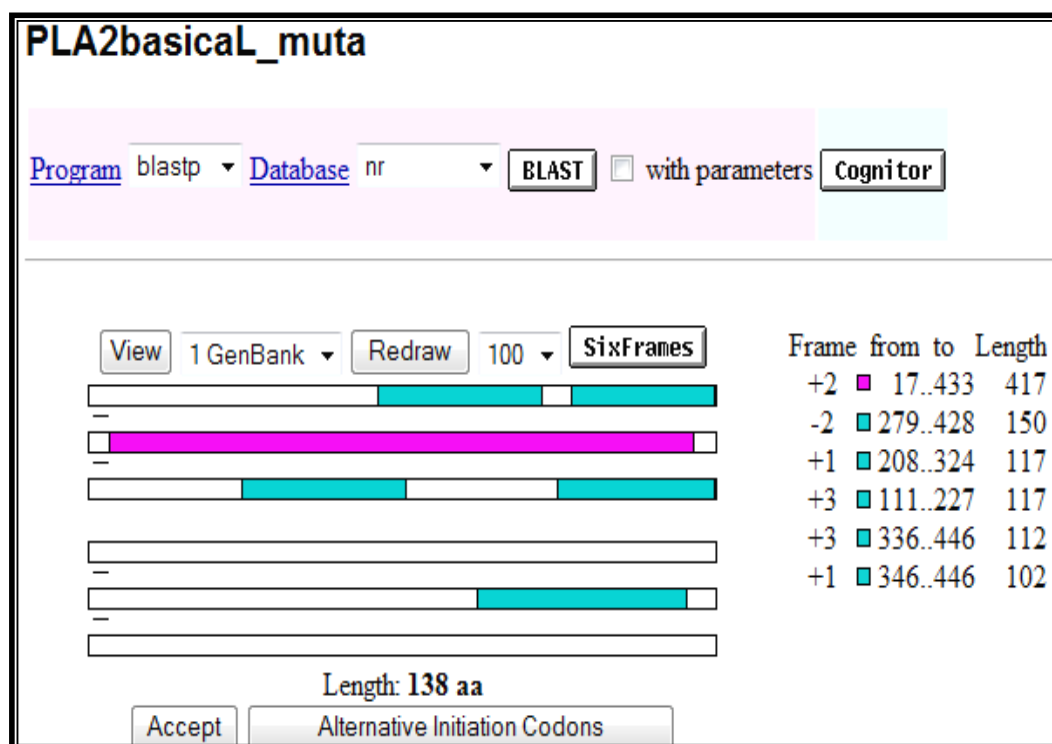


Figura 19. Secuencia génica de la PLA₂básical.muta. Marcos de lectura abierta para PLA₂básical.muta, se consideró el segundo fragmento (color lila) de 417 nucleótidos de longitud, de la posición 17 a la 433 y traduce 138 aminoácidos.

17	atgaggagtctcgggattatg	gccgtgttcttggtgggcgtcgag
	M R S L G I M A V F L V G V E	
62	gggcacgcgctgcaattcgggaagctgatcattaaaattgcggg	
	G H A L Q F G K L I I K I A G	
107	agaaatgggtatgttactacagcttttacggatgctactgcggc	
	R N G I L Y Y S F Y G C Y C G	
152	ctggggggccgagggccggccaaaggacgccactgaccgctgctgc	
	L G G R G R P K D A T D R C C	
197	tttgtgcacgactgctgttatggaaaagtgaccggctgcaacccc	
	F V H D C C Y G K V T G C N P	
242	aaaaaggacatatacacctacagcgagaagaacggggctatcgtc	
	K K D I Y T Y S E K N G A I V	
287	tgcggaggggacaacccgtgcaagaaggagatttgtgagtgcgat	
	C G G D N P C K K E I C E C D	
332	aaggatgctgcaatctgcttccgagacaatctggacacatacaac	
	K D A A I C F R D N L D T Y N	
377	aacaaatattgggttttcccgcgcaaatattgcaaggaggaatca	
	N K Y W F F P R K Y C K E E S	
422	gagccatgctaa	433
	E P C *	

Figura 20. Secuencia génica de la PLA₂básica *L.muta*.

Secuencia aminoácídica traducida a partir de la secuencia nucleotídica de Lm-PLA₂-Perú, en color celeste se muestra el codón de iniciación y en color rosado el codón stop.

El cDNA completo que codifica la PLA₂ de *Lachesis muta* (PLA₂básica *L.muta*) contiene 138 aminoácidos traducidos tanto por el programa *ORF Finder* como por *Translate tool* (<http://ca.expasy.org>), obteniendo la siguiente secuencia aminoacídica.

M R S L G I M A V F L V G V E G H A L Q F G K L I I K I A G R N G I L Y Y S F Y G C Y C L G G R G R P K D A T D R C C
F V H D C C Y G K V T G C N P K K D I Y T Y S E K N G A I V C G G D N P C K K E I C E C D K D A A I C F R D N L D T Y N
N K Y W F F P R K Y C K E E S P C

Esta misma cantidad de residuos es encontrado en Lm-PLA₂-Perú (Jiménez, 2009), así como en muchas serpientes de la familia Viperidae como *T. flavoviridis* y *T. gramineus*, el gen de esta enzima contienen 4 exones y 3 intrones codificando 138 residuos incluyendo el péptido señal (Ohno *et al.*, 2003).

La mayoría de las fosfolipasas A₂ de veneno de serpiente son extracelulares requiriendo del péptido señal que les permita ser secretadas, esta secuencia señal se encuentra en el extremo aminoterminal, es reconocida por la membrana celular, pasa a través de ella y se ancla para permitir el

paso de la proteína, por ultimo se asciende dejando a la proteína libre para que pueda ejercer su función.

Entonces para determinar la presencia de su péptido señal, como la ubicación de la PLA₂básica*L.muta*, se empleó el programa *SignalP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) el cual utiliza dos algoritmos para predecir la presencia del péptido señal y la posición exacta de los aminoácidos donde la peptidasa señal I (SPasa I) realizará la escisión del mismo. Los valores de C, S, Y, S-mean y D-score, indicando la presencia o no de un péptido señal; C, indica el lugar donde se realizará la escisión por la SPasa I. S, asigna valores a los aminoácidos, los porcentajes altos corresponden al péptido señal, mientras que los bajos indican que el aminoácido forma parte de la proteína madura. S-mean indica la media del valor S, se extiende desde el amino terminal hasta el aminoácido asignado con el porcentaje más alto para Y, este valor se calcula para predecir el tamaño del péptido señal. D-score, es un promedio de los valores S-mean y Y-max (Tabla 5).

Tabla 5. Determinación del péptido señal de PLA₂básica*L.muta*.

Medida	Posición	Valor	Péptido señal
Cmax	17	0.430	Si
Ymax	17	0.541	Si
Smax	13	0.989	Si
S-mean	1 ⁻¹⁶	0.909	Si
D.score	1 ⁻¹⁶	0.725	Si

Valores obtenidos del análisis de la presencia del péptido señal en PLA₂básica*L.muta* en el programa *SignalP*.

Se observa que la PLA₂básica *L.muta* presenta un péptido señal de 16 aminoácidos (tabla 4), cuya escisión se realiza a nivel de los aminoácidos 16 y 17, secuencia VEG-HAL (Figura 21), por lo tanto, la proteína madura está formada por 122 aminoácidos, perteneciendo a las fosfolipasa A₂ secretoras y como la serpiente peruana *Lachesis muta* es parte de la familia Viperidae la fosfolipasa estudiada es una sPLA₂ del grupo II.

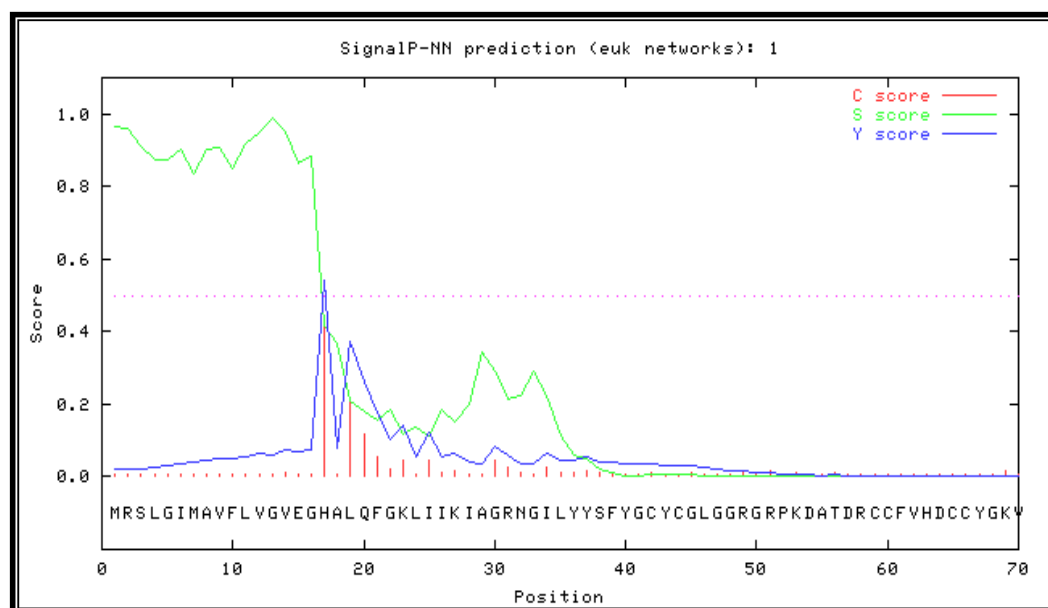


Figura 21. Ubicación del péptido señal PLA₂básica *L.muta*. El valor más alto de C (en rojo) indica lugar de la escisión entre la posición 16 y 17 G-H, los valores más altos de S (color verde) indican la secuencia del péptido señal.

Análisis de la Estructura Secundaria de la Fosfolipasa

Para determinar la estructura secundaria de la enzima se usó el programa PHDPBIL con el método PHD (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_phd.html), el cual de acuerdo a la interacción entre los aminoácidos indican la presencia de alfa hélice 31.97% (hH), random coil 54.10% (Cc) y láminas plegadas 13.93% (eE) (Figura 22). Indicando la presencia de 3 alfa helices, 1 lámina beta.

que forman la proteína madura, también se obtuvo el punto isoelectrico en 8,36; la composición de aminoácidos se muestra en la tabla 6, obteniendo 14 cisteínas lo que determinaría la formación de 7 puentes disulfuros como mínimo clasificándola como una proteína estable de bajo peso molecular y de naturaleza básica, estos datos se corroboran con los encontrados en la proteína purificada. Mientras que la Lm-PLA₂-Perú es una proteína con un peso molecular de 13,97 kDa y un pI de 5,66 (Jiménez, 2009) presentando hasta el momento la serpiente *Lachesis muta* de Perú dos isoformas una ácida y otra básica con pesos similares.

Tabla 6. Composición de aminoácidos de la PLA₂básica *L.muta*.

Aminoácido	Cantidad	%	Aminoácido	Cantidad	%
Ala (A)	6	4,9 %	Lys (K)	13	10,7 %
Arg (R)	6	4,9 %	Met (M)	0	0,0 %
Asn (N)	7	5,7 %	Phe (F)	6	4,9 %
Asp (D)	9	6,6 %	Pro (P)	5	4,1 %
Cys (C)	14	11,5 %	Ser (S)	3	2,5 %
Gln (Q)	1	0,8 %	Thr (T)	4	3,3 %
Glu (E)	6	5,7 %	Trp (W)	1	0,8 %
Gly (G)	13	10,7 %	Tyr (Y)	10	8,2 %
His (H)	2	1,6 %	Val (V)	3	2,5 %
Ile (I)	8	6,6 %	Pyl (O)	0	0,0 %
Leu (L)	5	4,1 %	Sec (U)	0	0,0 %

Por otro lado, se analizó la estructura tridimensional a partir de la secuencia aminoacídica madura, en base a la comparación con la fosfolipasa A₂ de *Bothrops jararacussu*, con el programa Cn3D4.1 la cual además de tener alta identidad 85 %, con la enzima en estudio, presenta también su estructura tridimensional (Murakami y Arni, 2003).

La estructura terciaria analizada por comparación, forma un canal hidrofóbico en la porción amino terminal donde se ubica el centro catalítico de la enzima, presenta la forma elipsoide aplanada, que se estabiliza por la presencia de 7 enlaces disulfuro altamente conservados, este patrón estructural es característico de las sPLA₂ del grupo II (Figura N 23).

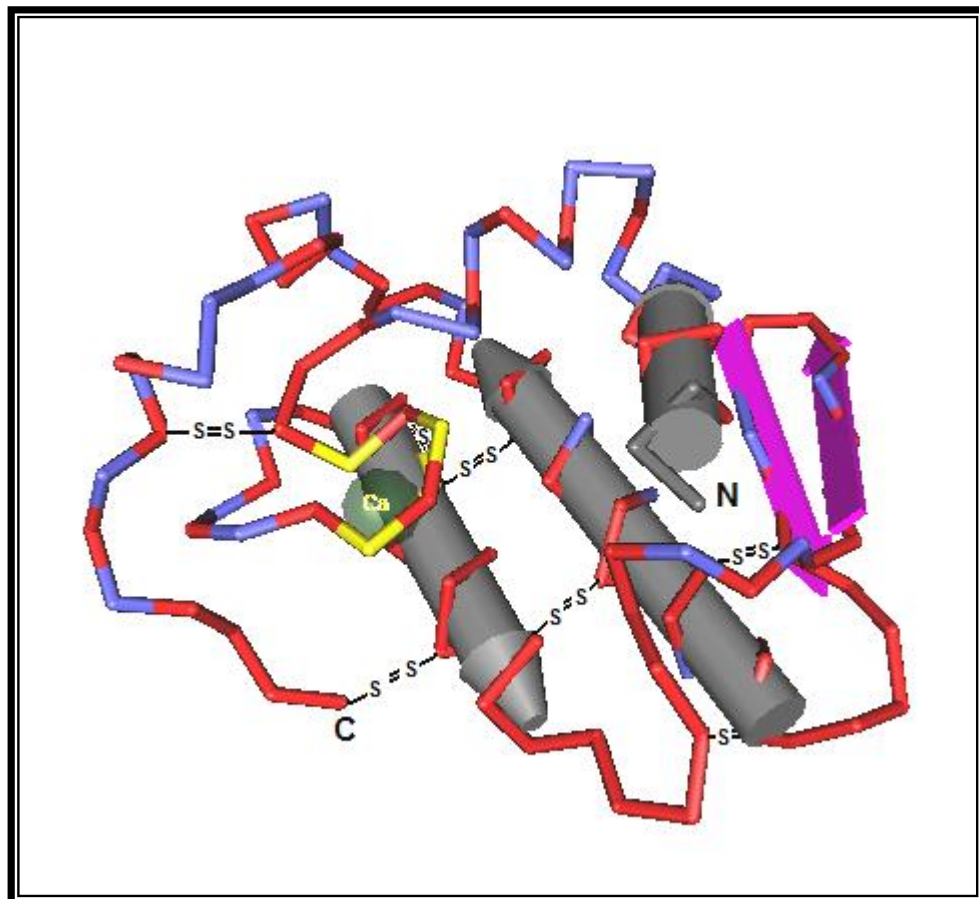


Figura 23. Modelo propuesto de estructura tridimensional de la PLA₂básica *L.muta*. Estructura obtenida por comparación con la fosfolipasa de *B. jararacussu*. En rojo, residuos conservados; en azul, residuos diferentes; en amarillo, sitio catalítico y de unión al calcio; en verde, ion calcio; en lila, lámina β; en plomo, hélice α. Las letras C y N representan los extremos carboxilo y amino terminal respectivamente.

Alineamiento de la secuencia protéica

Se realizó un alineamiento a la secuencia proteica madura con el programa Blastp, para compararla con otras reportada en los bancos de datos, encontrándose que tenía un 95% de similitud con la fosfolipasa A₂ Lm-PLA₂-Perú (Jimenez, 2009) y un 93% y 88% de similitud e identidad respectivamente con la fosfolipasa A₂ de *Lachesis stenophrys* y más del 80% de similitud con otras secuencias de sPLA₂ de serpientes de la familia Viperidae. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Alineamiento de la secuencia proteica de la PLA₂básica *L.muta*.

N° de acceso	Descripción	I%	S%	E value
ADB77855.1	phospholipase A2 [<i>Lachesis muta</i>]	91	95	2e-58
P84651.1	Phospholipase A2 [<i>Lachesis stenophrys</i>]: Full=LSPA-1	88	93	2e-57
AAR11860.1	Acidic phospholipase A2 [<i>Gloydius shedaoensis</i>]	80	92	2e-52
AAP48897.1	phospholipase A2 isozyme Ts-A1 [<i>Viridovipera stejnegeri</i>]	78	90	7e-53
BAA06552.1	phospholipase A2 precursor [<i>Trimeresurus gramineus</i>]	78	90	9e-53
AAW92117.1	Acidic phospholipase A2 [<i>Bothriechis schlegelii</i>]	77	90	2e-51
ABC96692.1	phospholipase A2 precursor [<i>Bothrops erythromelas</i>]	75	88	1e-49
AAW92121.1	Acidic phospholipase A2 [<i>Trimeresurus gracilis</i>]	74	88	3e-49
ABY77921.1	phospholipase A2 [<i>Sistrurus catenatus catenatus</i>]	72	86	9e-49
Q9I8F8.1	Phospholipase A2 [<i>Bothrops pictus</i>]	72	87	7e-48
ACV87234.1	BpirPLA2-I [<i>Bothrops pirajai</i>]	72	85	5e-46
1UMV X	Crystal Structure Of An Acidic, Non-Myotoxic Phospholipase A2 [<i>Bothrops Jararacussu</i>]	72	84	7e-45

I = Porcentaje de identidad.

S = Porcentaje de similaridad.

E value = score

La región N-terminal incluyendo el corto hélice forma parte del canal hidrofóbico, requerido para el efecto miotóxico, en experimento con bromuro de cianógeno y clivando esta región se observa la pérdida de la miotoxicidad, a la vez las substituciones que se dan pueden afectar el potencial del efecto biológico (Murakami y Arni, 2003). Realizando mutaciones químicas se observa la pérdida de algunos efectos biológicos, así tenemos que cuando se emplea el p - bromofenacil bromide, este agente alquila al residuo de Histidina, principalmente esta modificación en la posición 48 ocasiona la pérdida de la actividad enzimática y anticoagulante, siendo este un aminoácido esencial.

La modificación de los residuos de Tyr y Trp por agentes sulfonantes ocasiona una pequeña disminución en el efecto edemático y un poco mas notable en el efecto miotóxico. Por otra parte la acetilación del aminoácido Lys ocasiona una gran inhibición tanto del efecto miotóxico como edemático siendo muy similar cuando se carboximetila el extremo amino terminal (Soares y Giglio, 2003).

Por lo reportado se aprecia que las modificaciones en los residuos puede afectar la acción farmacológica de las sPLA₂; modificando la interacción en la estructura terciaria de estas enzimas, también se tiene presente que no solo es una región de la proteína la que determina sus efectos biológicos eso explicaría porque la PLA₂básica *L.muta* presenta un notable efecto edemático y hemorrágico así como moderado efecto miotóxico y la ausencia de efecto hemorrágico y anticoagulante.

Relación filogenética

El árbol filogenético fue construido en el programa MEGA5, en base a 10 secuencias nucleotídicas descritas en la tabla 4, todas pertenecientes al grupo Viperidae. Como modelo de sustitución se usó un parámetro (Jukes y Cantor, 1969), asumiendo una tasa de sustitución igual; también como un equilibrio de frecuencia igual para todas las bases. El algoritmo empleado

fue el Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987), este método analiza las secuencias basándose en distancias genéticas y agrupándolas (análisis por cluster).

En el estudio de las relaciones evolutivas entre especies, el DNA es la molécula más fácil de analizar y ofrece gran variedad de regiones. Por el contrario, las proteínas están sujetas a presiones selectivas, ocultan el uso preferente de codones y mutaciones silenciosas. Por este motivo, se usaron las secuencias nucleotídicas incluyendo parte de las secuencias 5' y 3' no traducidas y la secuencia que codifica el péptido señal,

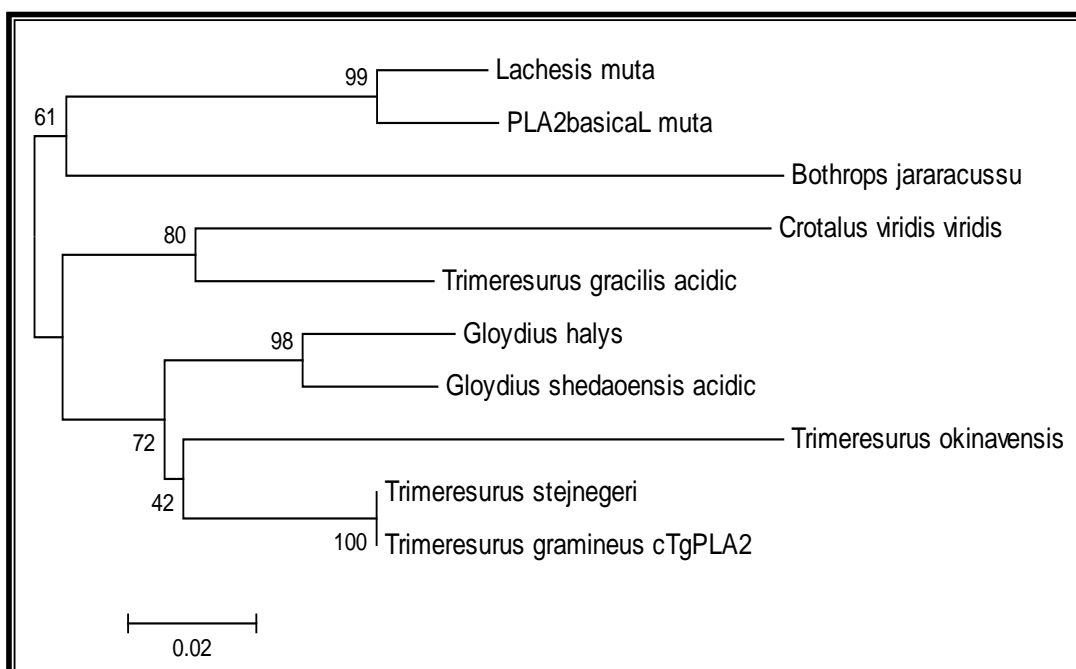


Figura 25. Árbol filogenético de PLA₂básicaL.muta. Basado en las secuencias nucleotídicas de PLA2 de la tabla 4, bajo el parámetro de Jukes y Cantor (1969), asumiendo una tasa de sustitución igual y con el algoritmo de Neighbor-Joining en el programa Mega5. Los valores en los nodos representan el soporte bootstrap y la escala representa el número de sustituciones por sitio.

Este árbol (figura 25) evidenció que la PLA₂básicaL.muta está evolutivamente más relacionada con la sPLA₂ de *L. muta* ácida, reportada por Jiménez (2009), ambas procedentes de Perú, a ellas se encuentra cercana la fosfolipasa A₂ ácida de *Bothrops jararacussu* (Murakami y Arni,

2003). También se puede apreciar dos grupos los cuales están evidentemente separados, la primera donde se encuentra los géneros *Lachesis* y *Bothrops* serpientes que habitan las Américas y el segundo grupo donde predominan los géneros que habitan Asia y Europa como *Trimeresurus* y *Gloydius*; exepctuando al género *Crotalus* que habita las Américas. La confiabilidad del árbol filogenético esta soportado por un bootstrap de 10000 réplicas y basada en la secuencias completas conteniendo los UTRs 5' y 3', péptido señal y la secuencia que codifica la proteína madura de las PLA₂, esto es consistente con la clasificación de las especies y subespecies por la taxonomía.

La acelerada evolución que ocurre en las isoenzimas permite adquirir una particular función, la relación entre las mutaciones y la fuerza de divergencia son especulativas y aún no se cuenta con un mecanismo real.

CONCLUSIONES

1. En el veneno de la serpiente *Lachesis muta* que habita en el Perú, se encontró una isoforma básica de la fosfolipasa A₂ (PLA₂básica*L.muta*), lo que constituye un nuevo hallazgo en su composición enzimática.
2. La purificación de PLA₂básica*L.muta* se realizó por tres pasos cromatográficos, lográndose un rendimiento de 63,8% con un factor de purificación de 41,2 veces.
3. La PLA₂básica*L.muta* es una enzima monomérica de bajo peso molecular y tiene un pH óptimo de 7,8.
4. El ion calcio es el mejor activador de esta enzima así mismo la fuerte inhibición por los agentes PMSF y EDTA sugieren que es una metaloproteína. En tanto que DTT, iodoacetato y glutatión la inhiben parcialmente por modificación de su estructura secundaria.
5. La PLA₂básica*L.muta* posee una fuerte acción hemolítica y edemática así como un moderado efecto mionecrótico, pero carece de efectos sobre el sistema de coagulación.
6. El antiveneno lachésico producido por el INS-PERÚ inhibe parcialmente a PLA₂básica*L.muta* tanto en su acción enzimática como biológica, lo que sugiere que es una molécula inductora de anticuerpos.
7. Los estudios *in silico* muestran que la región codificante de la PLA₂básica*L.muta* tiene 414 nucleótidos que codifica una proteína madura de 122 aminoácidos mas un péptido señal de 16 residuos, que se escinde a nivel de los residuos 16 y 17.

8. La secuencia aminoacídica analizada para PLA₂básica *L.muta* contiene residuos conservados para el sitio catalítico, His48, Asp49 y Tyr52, unión al Calcio en Tyr18, Gly30 y Gly32 y la presencia de 14 residuos de cisteína que le confieren estabilidad a la enzima.
9. Por modelaje tridimensional comparativo PLA₂básica *L.muta*, se mostró que la estructura secundaria esta formada por tres α -helices, una lamina β y un lazo de unión al calcio.
10. En relación con la estructura terciaria, por análisis *in silico* la PLA₂básica *L.muta* presenta un peso molecular de 13, 865 kDa y un punto isoeléctrico de 8,36.
11. La PLA₂básica *L.muta* es una enzima secretora del grupo II, que presenta mayor relación filogenético con su isoforma ácida de *L. muta*, seguida por PLA₂ ácida de *B. jararacussu*, ambas serpientes de la selva amazónica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Arita, H., Hanasaki, K., Nakano, T., Oka, S., Teraoka, H., Matsumoto, K., 1991. Novel proliferative effect of phospholipase A₂ in Swiss 3t3 cells via specific binding site. J. Biol. Chem. 266, 19139-19141.
- Ascencios, H., Cutti, F., 1995. Distribución geográfica de la fauna ofídica ponzoñosa en el Perú. Boletín de Lima N° 97, pp.91-96.
- Boffa, M. C., Dachary, J., Verheij, H. M., Rothen, C., Dupourco, J., Verger, R. G. H., De Haas., 1982. Do we know why some phospholipases A₂ are anticoagulant? Toxicon 20(1): 305.
- Carcasi, R. 1996. Purificación y caracterización parcial de la fosfolipasa A del veneno de la serpientes *Bothrops bilineatus* (loromachaco). Tesis para optar al título profesional de Biólogo. UNSA Arequipa - Perú.
- Cárdenas, T. Javier, 1993 Estudio proteico y enzimático en el veneno de tres especies de serpientes mantenidas en cautiverio. Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo. UNSA Arequipa - Perú.
- Carrillo de Espinoza, N., Icochea, J., 1995. Lista Taxonómica Preliminar de los reptiles vivientes del Perú. Publicaciones del Museo de Historia Natural. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. N°49:1-27.
- Castañón, Y., Zavaleta, A., Salas, M., Pancorbo. Z. y Rodríguez, M., 1993 Efectos letal, hemorrágico, coagulante, fosfolipásico y hemolítico de los venenos de las serpientes peruana *Lachesis muta muta* y *Bothrops barnetti*. Bol. Soc. Química del Perú Lima 59 pp. 38-48.
- Chem, I-J., Chiu, H-F., Huang, H-T., Teng, C-M. 1984. Edema formation and degranulation of Mast Cells by *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. Toxicon. 22, 17-28.

- Chiota, L., de Oliveira, A. H.C., Ruller, R., Sá, J. M., Ward, R. J., 2002.** Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the c-terminal region of a Lys49 phospholipase A₂. *Biochem. J.* 366, 971-976.
- Chippaux, J.P.; Williams, V.; White, J. 1991.** Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon.* 29, 1279-1303.
- Cintra, A., Marangoni, S., Oliveira, B., Giglio, J., 1993.** Bothropstoin-I: amino acid sequence and function. *J. Protein Chem.* 12, 57-64.
- Condrea, E., Barzilay, M., De Vries, A., 1964.** Hemolysis and splitting of human erythrocyte phospholipids by snake venom. *Biochem. Biophys. Acta* 84, 60.
- Damico, D., Lilla, S., De Nuca, G., Ponce-Soto, L., Winck, F., Novello, J., Marangoni, S., 2005a.** Biochemical and enzymatic characterization of two basic Asp 49 phospholipase A₂ isoforms from *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom. *Biochim. Biophys. Acta* 1726: 75-86.
- Damico, D.C.S., Bueno, L.G.F., Rodrigues-Simioni, L., Marangoni, S., Cruz-Höfling, M.A., Novello, J.C., 2005b.** Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. *Toxicon* 46, 222–229.
- Da Silva, M., Goulherme, O., 1982.** Titration of antiserum to South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by measuring inhibition of phospholipase A₂ activity. *Toxicon.* 20, 563-569.
- Dennis, E.A., Rhee, S.G., Billab, M.M., Hannun, Y.A., 1991.** Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J.* 5, 2068-2077.
- Dennis, E.A., 1994.** Diversity of group types, regulation, and function for phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 269, 13057-13060.

- De Oliveira, M. R., Palma, M. S., 1998. Polybitoxins: A group of phospholipase A₂ from the venom of the neotropical social Wasp Paulistina (*Polybia paulista*). *Toxicon* 36 (1): 189-199.
- De Oliveira, A. H., Giglio, J. R., Andrião-Escarso, S. H., Ward, R. J., 2001. The effect of resonance energy homorransfer on the intrinsic tryptophan fluorescence emission of the bothropstoxin I dire. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 284 (4), 1011-1015.
- Diaz-Oreiro, C., Gutierrez, J. M., 1997. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venom: effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon*. 35, 241-252.
- Diaz, C., Lomonte, B., Zamudio, F., Gutierrez, J.M., 1999. Purification and characterization of myotoxin IV, a phospholipase A₂ variant, from *Bothrops asper* snake venom. *J. Natural Toxins* 3: 26-31.
- Dufton, M., Hider, R., 1983. Clasification of phospholipase A₂ according to sequence. Evolutionary and pharmacological implications. *J. Biochem.* 137, 545-551.
- Fortes-Diaz, C., Jannoil, M., Franco, F., Magalhaes, A., Diniz, C., 1999. Studies on the specificity of CNF, a phospholipase A₂ inhibitor isolated from the blood plasma ob the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Interaction with PLA₂ from *Lachesis muta muta* snake venom. *Toxicon*. 37, 1747-1759.
- Fry, M. R., Ghosh, S. S., East, J. M., Franson, R. C., 1992. Role of human sperm phospholipase A₂ in fertilization: effects of a novel inhibitor of phospholipase A₂ activity on membrane perturbations and oocyte penetration. *Biol. Reprod.* 47, 751-759.

- Fuly, A.I., Calil-Elias, S., Zingali, R.B., Guimarães, J.A., Melo, P.A., 2000., Myotoxic activity of an acidic phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. *Toxicon*. 38, 961-972.
- Fuly, A. I., De Miranda, A. L., Zingali, R. B., Guimarães, J. A., 2002., Purification and characterization of a phospholipase A₂ isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. *Biochem. Pharmacol.* 63, 1589-1597.
- Gutierrez, J. M., Arroyo, O., Bolaños, R., 1980. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon* 18, 603-610.
- Gutierrez, J. M., Ownby, C., Odell, G., 1984. Isolation of a Myotoxin from *Bothrops asper* venom: Partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon*, 22(1): 115-128.
- Gutierrez, J. M., Lomonte, B., Cerdas, L. 1986. Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. *Toxicon*. 22, 115-128.
- Gutierrez, J. M., Avila, C., Rojas, E., Cerdas, L., 1988a. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*. 26, 411-413.
- Gutierrez, J. M., Lomonte, B., Rojas, G., Gene, J., Chaves, F., Estrada, R., Alvarado, J., Rojas, E., Robles, A. 1988b. El suero antiofídico polivalente producido en costa rica estabilidad y capacidad neutralizante. *Rev.Cost. Cienc. Méd.* 1988; 9(2): 155-169.
- Gutierrez, J. M., Ownby, C., 2003. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, 42: 915-931.

- Haberman, E., Hardt, K. 1972., A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Analyt. Biochem.* 50, 163.
- Hendon, R., Fraenkel-Conrat., 1971. Biological roles of the components of crotoxin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 68, 1560-1563.
- Inga, R., 2009. Caracterización biológica y acción de inhibidores de una fosfolipasa A₂ del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo. UNMSM. Lima-Perú.
- Instituto Nacional de Salud., 2008. Mordeduras de serpientes venenosas, e interculturalidad. Boletín del Instituto Nacional de Salud, Año 5-Nº 50.
- Iwanaga, S., Suzuki, T., 1979. Enzymes in snake venoms. In Lee. C. Y. Ed. Berlin, Springer V. 52. 61-158.
- Jain, M.K., Berg, O.G., 1989. The kinetics of interfacial catalysis by phospholipase A₂ and regulation of interfacial activation: hopping versus scooting. *Biochim. Biophys. Acta* 736, 127-156.
- Jensen, B., Burgess, N., Gonda, D., Spencer, E., Wilson-Ashworth, H., Driscoll, E., Vu, M., Fairbourn, J., Judd, A., Bell J. 2005. Mechanisms Governing the Level of Susceptibility of Erythrocyte Membranes to Secretory Phospholipase A₂. *J. Biophys* 88, 2692–2705.
- Jimenez, K., 2009. Clonaje y Caracterización Molecular *In silico* del gen de Fosfolipasa A₂ aislado del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. Tesis para optar al Grado de Magíster en Biotecnología. UNMSM. Lima-Perú.
- Jukes, T. H., Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. Pp. 21-123 in H. N. Munro, ed. *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York.

- Kaiser, I., Gutierrez, J. M., Plummer, D., Aird, S., Odeli, G. ,1990.** The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. Arch. Biochem. Biophys. 278, 319-325.
- Kasturi, S., Gowda, T. V., 1989.** Purification and characterization of a major phospholipase A₂ from Russell's viper (*Vipera russelli*) venom. Toxicon 27, 229-237.
- Kemparaju, K., Nijaguna, B., Gowda, V. 1994.** Purification of a basic phospholipase A₂ from indian saw scaled viper *Echis carinatus* venom: characterization of antigenic, catalytic and pharmacological properties. Toxicon. 32, 1178-1196.
- Khupulsup, K., Poopyruchpong, N., Rechclai, B., Ratanabanangkoon, C., 1981.** A passive hemagglutination test for antibody *Naja naja siamensis* toxin 3. Toxicon. 19, 863.
- Kini, R. M., Evan, H.,1997.** Effects of phospholipases A₂ enzymes on platelet aggregation. In: Kini, R: Ed Venom Phospholipase A₂ enzymes, Wiley, England, pp. 369- 387.
- Kini, R.M., 2003.** Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. Toxicon 42, 827-840.
- Kondo, H., S. Kondo, I., Ikezawa, R., Murata., Osaka, A., 1960,** Studies on the quantitative method for the determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. Japan. J. Med. Sci. Biol. 13: 43-51.
- Kudo, I., Murakami, M., Hara, S., Inoue, K., 1993.** Mammalian nonpancreatic phospholipases A₂. Biochim. Biophys. Acta 1170, 217-231.
- Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

- Lehr, M. 2001. Phospholipase A₂ inhibitors in inflammation. Exp. Op. Therapeutic Patents. Vol. 11, No. 7 : 1123-1136.
- Li Y, Yu BZ, Zhu H, Jain MK, Tsai MD. 1994. Phospholipase A₂ engineering. Structural and functional roles of the highly conserved active site residue aspartate-49. Biochemistry. 13;33(49):14714-22.
- Liu, S. Y., Yoshizumi, K., Oda, N., Ohno, M., Tokunaga, F., Iwanaga, S., Kihara, H., 1990. Purification and amino acid sequence of basic protein II, a lysine-49-phospholipase A₂ with low activity, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. J. Biochem. (Tokyo) 107, 400-408.
- Lizano, S., Lambeau, G., Lazdunski, M., 2001. cloning and cDNA sequence analysis of Lys 49 and Asp 49 basic phospholipase A₂ myotoxin isoforms from *Bothrops asper*. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 33, 127-132.
- Lomonte, B., 1985. Edema-forming activity of bushmaster (*Lachesis muta stenophrys*) in Central American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venoms neutralization by a polyvalent antivenom. Toxicon. 23, 173-176.
- Lomonte, B., Gutierrez, J. M., 1989. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). Toxicon. 27, 725-733.
- Lomonte B, Angulo Y, Calderon L., 2003. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. Toxicon. 15;42(8):885-901.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193:265-275.
- Martin, S., Luthra, M., Wells, M., Wats, R., Hanahan, D., 1975. Phospholipase A₂ as a probe of phospholipid distribution in erythrocyte membranes: factors influencing the apparent specificity of the reaction. Biochemistry. 14. 5400.

- Marshall, L. A., Chang, J. Y., Calhoun, W., Yu, J. Carlson, R. P.** 1989, Preliminary studies on phospholipase A₂-induced mouse paw edema as a model to evaluate antiinflammatory agents. *Journal of Cellular Biochemistry*, 40: 147–155.
- Mejia, J., Inga, R., Lazo, F., Rodriguez, E., Yarleque, A., Zavaleta, A.,** 2006. Purificación y propiedades bioquímicas de una fosfolipasa A₂ del veneno de la serpiente *Lachesis muta* “shushupe”. *Rev. Soc. Química del Perú*. Vol 72 N °2 pag 86 –95.
- Minh-Zhou, H., Quing-Chuan, W., Guang-Fen, L.** 1993. Effects of an acidic phospholipase A₂ purified from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom on rat heart. *Toxicon*. 31, 5, 627-635.
- MINSA,** 2004. Norma técnica sobre prevención y tratamiento de accidentes por animales ponzoñosos. NT No. 007-MINSA/DGSP-V.01.
- Moreira, L. A., Ito, J., Ghosh, A., Devenport, M., Zieler, H., Abraham, E. G., Crisanti, A., Nolan, T., Catteruccia, F., Jacobs-Lorena, M.,** 2002. Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *J. Biol. Chem.* 277, 40839-40843.
- Murakami, M., Kudo, I.,** 2002. Phospholipase A₂. *J. Biochem.* 185, 263-270.
- Murakami, M., Arni, R.,** 2003. A structure based model for liposome disruption and the role of catalytic activity in myotoxic phospholipase A₂s. *Toxicon*. 42, 8, 903-913.
- Nisembum, C., Vidad, J.,** 1986. Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (Víbora de la Cruz) venom purification and some characteristics properties. *Toxicon*. 24, 3, 259-273.

- Nuñez, V., arce, V., Guitiérrez, J.M., Lomonte, B., 2004. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. *Toxicon*. 44, 91-101.
- Ohno, M., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., Ogawa, T., Hattori, S., 2003. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A₂ from snake venom. *Toxicon*. 42, 841-854.
- Ouchterlony, O., Nilsson, L. A., 1967. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *Handbook of Experimental Immunology*. I (34): 655-660.
- Ownby, C., Colberg, T., White, S., 1997. Isolation, characterization and crystallization of a phospholipase A₂ myotoxin from the venom of the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Toxicon* 35 (1): 111-124.
- Ownby, C., Selistre de Araujo, H., White, S. and Fletches, J. 1999. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. *Toxicon* 37, 411-445.
- Pantigoso, C., Escobar, E., Yarlequé, A. 2001. Aislamiento y caracterización de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* (Ophidia: Viperidae). *Rev. Peru. de Biol.* 8 (2): 136-148.
- Pesantes, O., 2000. Prevención y Tratamiento de Accidentes por Serpientes Venenosas. Oficina de Relaciones Públicas SEDAPAL. Lima-Perú.
- Rojas, G., Gutiérrez, J. M., Gené, J. A., Gómez, M., Cerdas, L., 1987. Neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas de cuatro venenos de serpientes de Guatemala y Honduras por el antiveneno polivalente producido en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 35: 59-67.
- Rudrarrimaji, L. M .S., Gowda, T. V., 1998. Purification and characterization of three acidic, cytotoxic phospholipases A₂ from Indian Cobra (*Naja naja naja*) venom. *Toxicon* 36(6): 921-932.

- Saitou, N., Nei, M., 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Scott DL, White SP, Otwinowski Z, Yuan W, Gelb MH, 1990. Sigler PB.** Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. *Science*. 14; 250(4987):1541-6.
- Slotta, K.H., Fraenkel-Conrat. H.L.,1938-1939.** Estudos quimicos sobre os venenos ofidicos. 4. Purificação e cristalização do veneno de cobra cascavel. *Mem. Inst. Butantan* 12; 505-513.
- Soares, A., Rodriguez, B., Homsí-Brandeburgo, M., Toyoma, M., Lombardi, F., Arni, R., Giglio, J., 1998.** A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (Caissaca) venom: Biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. *Toxicon*. 36, 503-514.
- Soares, A. M., Giglio, J. R., 2003.** Chemical modifications of phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. *Toxicon* 42, 8, 855-868.
- Takasaki, C., Yutani, F., Kajiyaishi, T., 1990.** Amino acid sequences of eight phospholipase A₂ from the venom of Australian King Brown snake *Pseudechis australis*. *Toxicon* 28, 329-339.
- Theakston, R., Reid, H., 1979.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency. *Toxicon* 17, 511.
- Touqui, L., Alaoui-El-Azher, M., 2001.** Mammalian secreted phospholipases A₂ and their pathophysiological significance in inflammatory diseases. *Curr. Mol. Med.* 1, 739-754.

- Toyoma, M., Mancuso, L., Giglio, J., Novello, J., Oliveira, B., Marangoni, S., 1995. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins-I and II, two myotoxins from *Bothrops pirajai* snake venom: N-terminal sequencing. *Biochem. Mol. Bio. Int.* 37, 1047-1055.
- Tu, A., Passey, R., Toom, P. 1970. isolation and characterization of phospholipase A from sea snake *Laticauda semifasciata* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 140, 96-106.
- Verheij, H. M., Slotboom, A. J., De Haas, G. H., 1981. Structure and function of phospholipase A₂. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 91, 92-203.
- Vidal, J. C., Stoppani, A.O.M., 1971. Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms *archives of Biochemistry and Biophysics.* 145: 543-555.
- Vishawanath, B. S., Kini, R. M., Gowda, T. V., 1985. Purification of an edema inducing phospholipase A₂ from *Vipera russelli* venom and its interaction with aristolochic acid. *Toxicon* 23, 617.
- Vital-Brazil, O., 1987. History of the primordia of snake-bite accident serotherapy. *Memorias Instituto Butantan* 49: 7-20.
- Warburg, O., Christian, W., 1941. Isolierung and Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem.* 2(130): 384-421.
- Woll, P. 1976. Aislamiento y purificación parcial de una fosfolipasa A en el veneno de la serpiente *Lachesis muta*. Análisis de algunos métodos usados en la determinación de su actividad. Tesis de Bachiller en Ciencias Biológicas. UNMSM. Lima - Perú.
- World Health Organization., 1981. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenom. Geneva: Worl Health Organization.

- Yamakawa, M., Nosake, M., Hokama, Z., 1976. Fractionation of Sakishima-hyabu (*Trimererusus elegants*) venom, and letal, hemorrhagic and edemaforming activities of the fractions. In animal, plant, and microbial toxins. Biochemistry, 6, 113-124.
- Yarlequé, A., Campos, S., Escobar, E., Lazo, F., Sanchez, N., Hyslop, S., Marsh, N. A., Butterworth, P. J. and Price, R. G., 1989. Isolation and characterization of a Fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake *Lachesis muta muta* (Peruvian Bushmaster). Toxicon, 27, 1189-1197.
- Yarlequé, A., 2000. Las Serpientes Peruanas y sus venenos. Fondo Editorial de la UNMSM.
- Zevallos, J. 1996. Aislamiento y caracterización parcial de la fosfolipasa A presente en el veneno de la serpiente *Bothrops brazili* (Jergón shushupe). Tesis para optar al título profesional de Biólogo. UNMSM. Lima-Perú.
- Zieler, H., Keister, D. B., Dvorak, J. A., Ribeiro, J. M. C., 2001. A snake venom phospholipase blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. J. Experimental Biology. 204, 4157-4167.